Aus dem
Medizinischen Institut für Umwelthygiene
an der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. H. - W. Schlipköter

# Der Einfluß von Blei auf die Entwicklung von Lungenmetastasen nach intravenöser Injektion syngenischer Tumorzellen in Inzuchtmäusen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Georg W. Wille

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536528_0022

Aus dem
Medizinischen Institut für Umwelthygiene
an der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. H. - W. Schlipköter

# Der Einfluß von Blei auf die Entwicklung von Lungenmetastasen nach intravenöser Injektion syngenischer Tumorzellen in Inzuchtmäusen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Georg W. Wille

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

GEDRUCKT MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DOSSELDORF

DER DEKAN
GEZ.: PROF. DR. M. STRASSBURG

REFERENT
GEZ.: PROF. DR. H.W. SCHLIPKÖTER

KORREFERENT
GEZ.: PROF. DR. W. HORT

MEINER MUTTER

INHALTSVERZEICHNIS


| | | |
|---|---|---|
| 1. | DIE IMMUNOLOGISCHE TUMORABWEHR | 1 |
| 1. 1. | Einleitung | 1 |
| 1. 2. | Voraussetzungen für die immunologische Überwachung von Tumorzellen | 1 |
| 1. 3. | Tumorzellen als Träger von Tumor - Antigenen | 3 |
| 1. 3. 1. | Tumorassoziierte Transplantationsantigene | 3 |
| 1. 3. 2. | Antigene bei virusinduzierten Tumoren | 3 |
| 1. 3. 3. | Onkofetale Antigene | 4 |
| 1. 4. | Der Mechanismus der immunologischen Tumorabwehr | 5 |
| 1. 5. | Störfaktoren der immunologischen Tumorabwehr | 6 |
| 1. 5. 1. | Das Fehlen tumorspezifischer Antigene | 6 |
| 1. 5. 2. | Mangelnde Immunogenität des Tumors | 6 |
| 1. 5. 3. | Sehr hohe Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors | 7 |
| 1. 5. 4. | Einfluss immunsuppressiver Substanzen | 7 |
| 1. 5. 5. | Antigene Modulation | 8 |
| 1. 5. 6. | Die Entwicklung des Tumors an privilegierter Stelle | 8 |
| 1. 5. 7. | Suppressor Zellen als Schutzfaktoren | 8 |
| 1. 5. 8. | Enhancement | 8 |
| 2. | DIE BELASTUNG DES MENSCHEN DURCH BLEIVERBINDUNGEN UND IHR EINFLUSS AUF DAS IMMUNSYSTEM | 11 |
| 2. 1. | Blei und Bleiverbindungen als Umweltgifte | 11 |
| 2. 2. | Die Aufnahme von Blei durch den Menschen | 11 |
| 2. 3. | Der Einfluss von Blei auf das Immunsystem | 13 |
| 2. 3. 1. | Der Einfluss von Blei auf die Antikörperbildung | 13 |
| 2. 3. 2. | Der Einfluss von Blei auf die Makrophagen | 14 |
| 3. | BLEIBELASTUNG UND TUMORENTWICKLUNG | 17 |
| 4. | PROBLEMSTELLUNG | 18 |
| 5. | METHODEN UND MATERIALIEN | 19 |
| 5. 1. | Das Versuchsmodel | 19 |
| 5. 2. | Die Versuchstiere | 19 |
| 5. 3. | Der Tumor | 20 |

| | | |
|---|---|---|
| 5. 4. | Die Erzeugung von Lungenmetastasen | 22 |
| 5. 5. | Die Präparation der Lungen und die Darstellung der Metastasen | 23 |
| 5. 6. | Die Auswertung der Metastasen | 25 |
| 5. 6. 1. | Die Bestimmung der Metastasen nach Zahl und Grösse | 25 |
| 5. 6. 2. | Metastasenflächen als Messwerte | 26 |
| 5. 7. | Die Bleibelastung der Versuchstiere | 27 |
| 5. 8. | Der Blutbleispiegel | 28 |
| 6. | DIE VORVERSUCHE | 30 |
| 7. | ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE | 31 |
| 7. 1. | Die Anzahl der Metastasen in den Grössenklassen | 31 |
| 7. 2. | Die Gesamtfläche der Metastasen pro Tier<br>Mittelwerte der Metastasenflächen<br>Standardabweichungen der Mittelwerte<br>Vertrauensbereiche der Mittelwerte | 32 |
| 7. 3. | Vergleich der Mittelwerte | 35 |
| 8. | DISKUSSION DER ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE | 36 |
| 9. | DER HAUPTVERSUCH | 37 |
| 10. | ERGEBNISSE DES HAUPTVERSUCHS | 38 |
| 10. 1. | Die Anzahl der Metastasen in den Grössenklassen | 38 |
| 10. 2. | Die Gesamtfläche der Metastasen pro Tier | 42 |
| 10. 3. | Die Häufigkeitsverteilung der Gesamtflächen innerhalb der Versuchsgruppen | 44 |
| 10. 4. | Mittelwerte der Metastasenflächen<br>Standardabweichung der Mittelwerte<br>Vertrauensbereiche der Mittelwerte | 46 |
| 10. 5. | Bartlett - Test auf Varianzgleichheit<br>F - Test | 49 |
| 10. 6. | Vergleich der Mittelwerte | 50 |
| 11. | DISKUSSION DER ERGEBNISSE DES HAUPTVERSUCHS | 51 |
| 12. | ZUSAMMENFASSUNG | 57 |
| 13. | LITERATURANGABEN | 58 |

# 1. DIE IMMUNOLOGISCHE TUMORABWEHR

## 1. 1. Einleitung

Bei der Aufrechterhaltung der körperlichen Integrität jedes tierischen oder menschlichen Organismus kommt dem Immunsystem die entscheidende Rolle zu.
Daß dieses insbesondere für die Abwehr eingedrungener Mikroorganismen wie Bakterien oder Viren gilt, ist seit langer Zeit bekannt. Dies gilt ebenso für die Aufgaben des Immunsystems bei der Abstoßung von Fremdgewebe.
Die Beobachtung, daß ein Embryo nicht vom Immunsystem der Mutter abgestoßen wird, obwohl der Embryo Transplantationsantigene des Vaters trägt, führte zu der Frage, welche Schutzfaktoren das Immunsystem in diesem Fall blockieren.

Darüberhinaus stellt sich die Frage, ob ähnliche Schutzfaktoren auch das Wachstum von Tumoren begünstigen können, indem diese sich, obwohl sie Träger von Antigenen sind, die vom Wirtsorganismus als fremd erkannt werden müßten, der Kontrolle durch das Immunsystem entziehen.

## 1. 2. Voraussetzungen für die immunologische Überwachung von Tumorzellen

Konnte die Schwierigkeit, Tumoren allogen zu transplantieren noch mit der Existenz normaler Transplantationsantigene auf den Tumorzellen erklärt werden, so setzte sich, nach der Entwicklung von Inzuchtstämmen als Versuchstiere für die Tumorforschung, immer mehr die Auffassung durch, daß Tumorzellen Träger tumorspezifischer Antigene sind.
Darüberhinaus konnte bei einzelnen von einem Tumor befallenen Patienten beobachtet werden, daß sich Tumoren oder deren Metastasen spontan zurückbilden.

Diese Beobachtungen haben den Gedanken nahegelegt, daß es eine immunologische Kontrolle des Tumorwachstums gibt.

Nach der von BURNET, 1970, vertretenen "Immunüberwachungstheorie" bilden sich in jedem Organismus laufend neoplastisch transformierte Zellen, die durch ein funktionsfähiges Immunsystem sofort zerstört werden.

Nach SELL, 1977, der sich dabei auf eine Veröffentlichung von PREHN beruft, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein, damit eine Immunüberwachung sinnvoll stattfinden kann:

1. Die Tumorzelle, welche sich im Organismus gebildet hat, muß Träger von Antigenen sein.
2. Die Tumor - Antigene müssen sehr frühzeitig in der Entwicklung des Tumors auftreten.
3. Das Tumor - Antigen muß immunogen sein, es muß also in der Lage sein, eine Immunreaktion hervorzurufen.
4. Jede Tumorzelle muß ein erkennbares Antigen tragen.
5. Die Ausprägung des Tumor - Antigens muß konstant sein.
6. Der Organismus, in dem sich die Tumorzelle gebildet hat, muß immunologisch kompetent sein, auf die Tumorzelle, beziehungsweise auf das Tumor - Antigen, zu reagieren.
7. Die Immunreaktion des Organismus gegen den Tumor muß in der Lage sein, die Tumorzellen zu zerstören oder zumindest in ihrem Wachstum zu hemmen.
8. Die Immunreaktion darf nicht zu einer Toleranzentwicklung gegenüber dem Tumor führen (Enhancement).

## 1. 3. Tumorzellen als Träger von Tumor - Antigenen

### 1. 3. 1. Tumorassoziierte Transplantationsantigene

Tumorassoziierte Transplantationsantigene (TATA), die häufig auch als Tumorspezifische Transplantationsantigene (TSTA) bezeichnet werden (KOLDOVSKY, 1969), können durch Transplantation auf Tiere des selben Inzuchtstammes nachgewiesen werden (SJÖGREN, 1965). Beim Menschen, wo sich in vivo Versuche verbieten, können Immunreaktionen gegen Tumorassoziirte Transplantationsantigene durch in vitro Versuche nachgewiesen werden.
Tumorassoziierte Transplantationsantigene lassen sich in der Regel bei spontan entstandenen aber auch bei durch physikalische oder chemische Reize hervorgerufenen Tumoren nachweisen (SJÖGREN, 1965). Dabei ist von besonderer Bedeutung, daß die antigenische Struktur dieser Antigene von Tumor zu Tumor verschieden ist. Sogar zwei Tumoren, die durch chemischen oder physikalischen Reiz auf ein und demselben Tier hervorgerufen wurden, weisen unterschiedliche Tumorassoziierte Transplantationsantigene auf.

TATA sind wahrscheinlich Proteine oder Glykoproteine, die auch Bestandteile der Zellmembran sein können (Zit. nach SELL, 1977).

### 1. 3. 2. Antigene bei virusinduzierten Tumoren

Tumoren,die durch einen Virus hervorgerufen wurden, tragen Antigene, die für den Virus charakteristisch sind. Die Tumoren tragen also virusspezifische Transplantationsantigene auf ihrer Zelloberfläche (HUMPHREY, 1972) . Begründet wird diese Beobachtung mit dem Einbau eines Teils des Virusgenoms in die DNS oder RNS der Wirtszelle, wodurch diese zur Tumorzelle transformiert wird (HUMPHREY, 1972).
Unter dieser Voraussetzung, erklärt sich auch die Tatsache, daß die Immunisierung mit einem virusinduzierten Tumor eine Resistenz gegenüber der erneuten Implantation syngenischen

Tumorgewebes hervorruft, welches durch den gleichen Tumor induziert wurde. Sogar die Immunisation mit lebenden Viren, die Tumoren hervorrufen können, führte zur Entwicklung einer Resistenz gegen die Transplantation des Tumors, der durch ein solches Virus induziert wurde (SJÖGREN, 1965).

### 1. 3. 3. Onkofetale Antigene

Bei Transplantationsversuchen mit Tumoren beobachtete bereits SCHOENE, 1906, daß Tiere Tumoren abstießen, nachdem sie mit embryonalem Gewebe immunisiert worden waren; Bei nicht immunisierten Tieren führte die Inokulation des Tumorgewebes zum Tode.
Diese Beobachtung und die Entdeckung von humoralen Antikörpern, die mit embryonalem und tumorösem Gewebe kreuzreagierten (HIRSZFELD, 1929; WITEBSKY, 1930) , legten den Schluß nahe, daß Tumoren und embryonales Gewebe gemeinsame Antigene enthalten.
Dabei handelt es sich um Antigene, die durch eine in der Zelle normalerweise vorhandene genetische Information geprägt werden. Diese Information wird jedoch in normalen Erwachsenenzellen nicht verwendet; erst bei einer malignen Transformation der Zelle kommt es zur Depression dieser Gene und damit zur Ausprägung der onkofetalen Antigene (KOLDOVSKY, 1974).

Heute sind eine Reihe von onkofetalen Antigenen bekannt, von denen insbesondere das Karzinoembryonale - Antigen und das Alpha – Fetoprotein bereits klinische Bedeutung erlangt haben.

Für nahezu alle experimentellen Tumore, aber auch für sehr viele menschliche Tumore wurde nachgewiesen, daß diese Träger tumorassoziierte Antigene sind.

## 1. 4. Der Mechanismus der immunologischen Tumorabwehr

Der entscheidende Mechanismus für die Bekämpfung solider Tumore durch das Immunsystem ist eine Oberempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp, eine Reaktion also, wie sie auch gegen transplantierte Fremdgewebe zustande kommt.
Darüberhinaus scheinen bei einigen Tumoren die in Suspension wachsen (Leukämie), Antikörper und Komplement für die Zerstörung der Tumorzellen von großer Bedeutung zu sein (Zit. nach SELL, 1977).

Bei der Oberempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp steht der Kontakt zwischen einem T - Lymphozyten und einer Tumorzelle, genauer dem Carrieranteil des Tumorantigens, am Beginn der Reaktion. Dieser antigenstimulierte T - Lymphozyt beginnt sich anschließend zu teilen und bildet einen Klon spezifisch stimulierter T - Lymphozyten.
Einige dieser T - Lymphozyten, die sogenannten Effektor - T - Zellen, reagieren nun mit ihren Target - Zellen, den Tumorzellen. Diese Reaktion führt nicht nur zu einer zytotoxischen Wirkung auf die Tumorzelle, sie führt auch, möglicherweise über die Freisetzung von Mediatorsubstanzen (Lymphokininen), zu einer spezifischen Aktivierung von Makrophagen. Diese wandern in großen Mengen in das Gebiet der Target - Tellen und bewirken eine Zerstörung der Tumorzellen (Zit. nach SELL, 1977).
Die Stimulierung dieser Makrophagen kann darüberhinaus auch unspezifisch erfolgen, wie zum Beispiel durch Verabreichung von BCG.

Ein anderer Teil der initial entstandenen spezifisch stimulierten Lymphozyten, die sogenannten Helfer - T - Lymphozyten, helfen Antigen stimulierten B - Lymphozyten dabei, sich zu Plasmazellen zu entwickeln und spezifische, gegen das Tumorzellantigen gerichtete Antikörper zu produzieren.
Insgesamt gesehen kommt der zellulären Tumorabwehr jedoch eine bedeutendere Rolle zu als der humoralen Tumorabwehr.

## 1. 5. Störfaktoren der immunologischen Tumorabwehr

Setzt man voraus, daß Tumorzellen Träger tumorspezifischer Antigene sind und daß das Immunsystem das den Tumor tragenden Organismus grundsätzlich in der Lage ist, die Tumorzellen zu erkennen und abzutöten, so wirft dies die Frage auf, auf welch Art und Weise es den sich entwickelnden Tumorzellen gelingt, der immunologischen Überwachung zu entgehen.

In der Tat gibt es eine Reihe von Mechanismen, die es dem Tumor ermöglichen, sich gegen das Immunsystem zu behaupten und letztlich den Träger des Tumors zu töten.

### 1. 5. 1. Das Fehlen tumorspezifischer Antigene

Fehlen der Tumorzelle tumorspezifische Antigene, so wird in einem Organismus, der die gleichen Transplantationsantigene trägt wie die Tumorzelle, selbstverständlich keine immunologische Reaktion ausgelöst, da der Tumor nicht als fremd erkannt werden kann.
BALDWIN, 1970, beschreibt einen solchen Tumor, bei dem er keine tumorspezifischen Antigene nachweisen konnte. Dennoch dürfte diese Erscheinung eine seltene Ausnahme darstellen.

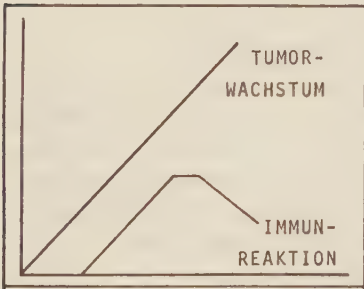
### 1. 5. 2. Mangelnde Immunogenität des Tumors

Besitzt der Tumor nur eine schwache Immunogenität, so rufen kleine Mengen an Tumorzellen nur eine sehr geringe Stimulation des Immunsystems hervor, es kommt nicht zur Ausbildung einer wirksamen Immunreaktion gegen den Tumor. Man spricht vom Einschleichen (sneaking through) der Tumorzellen. Hat der Tumor jedoch erst einmal eine gewisse Größe erreicht und ist nun in der Lage das Immunsystem ausreichend zu stimulieren, so ist die Möglichkeit des Immunsystems, diese großen Tumormassen durch die Produktion von Immunzellen zu bekämpfen, sehr stark eingeschränkt. Es liegt

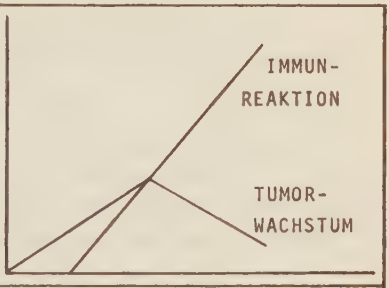
ein Mißverhältnis zwischen der Tumormasse und der Möglichkeit des Organismus zur Bildung von Immunzellen vor.
Das Tumorwachstum entgeht dem Immunsystem also so lange, bis es durch dieses nicht mehr wirksam bekämpft werden kann.

### 1. 5. 3. Sehr hohe Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors

Zu ähnlichen Verhältnissen wie bei der mangelnden Immunogenität des Tumors kommt es bei Tumoren mit sehr kurzen Zellzykluszeiten und damit hohen Wachstumsgeschwindigkeiten. Hier wächst der Tumor mit einer solchen Geschwindigkeit, daß dem Immunsystem keine ausreichende Gelegenheit bleibt, sich voll zu entwickeln, bevor der Tumor eine kritische Größe überschritten hat. Anschließend kommt es zur Erschöpfung des Immunsystems (KOLDOVSKY, 1974).




Graphik: Vergebliche Reaktion des Immunsystems bei sehr hoher Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors.




Graphik: Erfolgreiche Reaktion des Immunsystems bei geringerer Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors.

### 1. 5. 4. Einfluss immunsuppressiver Substanzen

Bei einer lange anhaltenden Immunsuppression durch Zytostatica, Corticoide sowie anderer Immunsuppressiva kommt es ebenso wie bei angeborenen Immunsystemdefekten zu einem gehäuften Auftreten von Tumoren (Sell, 1977).

### 1. 5. 5. Antigene Modulation

Der Verlust der Antigenität oder die Möglichkeit, die antigenische Struktur stark zu ändern, können einem Tumor die Möglichkeit geben, den immunologischen Abwehrmechanismen zu entgehen (Zit. nach SELL, 1977).

### 1. 5. 6. Die Entwicklung des Tumors an privilegierter Stelle

Als für die Entwicklung von Tumoren oder Transplantaten besonders privilegiert bezeichnet man solche Stellen im Organismus, wo diese der Kontrolle des Immunsystems besonders gut entgehen können. Solche Stellen sind zum Beispiel die vordere Augenkammer, das Gehirn und die Backentasche des Hamsters. Letztere wird deshalb häufig zur Züchtung von Tumoren für experimentelle Untersuchungen benutzt.

### 1. 5. 7. Suppressor Zellen als Schutzfaktoren

Als Reaktion auf den Tumor kann es nicht nur zu Bildung von Killer - Zellen kommen, die den Tumor zerstören, sondern auch zur Produktion von Suppressor - Zellen, die den Tumor schützen, indem sie eine unspezifische Suppression der zellulären Immunantwort induzieren (GORCZYNSKI, 1974).

### 1. 5. 8. Enhancement

Unter den Faktoren, die in der Lage sind, das Tumorwachstum zu fördern, nimmt das Enhancement mit Abstand die wichtigste Stelle ein.
Entdeckt wurde dieses Phänomen bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts bei Versuchen, Tiere mit abgetöteten Tumorzellen zu immunisieren und somit bei einer erneuten Inokulation von lebenden Tumorzellen zu schützen.
Es wurde festgestellt, daß eine Immunisierung des Versuchstieres die Entwicklung nachfolgend injizierter Tumorzellen, mit der gleichen antigenischen Struktur wie das Material mit dem immunisiert wurde, nicht behindert. Im Gegenteil, die Tu-

morentwicklung wurde gefördert.
Versuche, bei denen Tumorzellen in vitro mit dem Serum immunisierter Tiere inkubiert wurden, haben gezeigt, daß auch diese Zellen, anschließend bei Versuchstieren inokuliert, bessere Wachstumsbedingungen hatten als bei unbehandelten Tumorzellen (KOLDOVSKY, 1974). Damit war gezeigt, daß die das Enhancement verursachenden Faktoren im Serum vorliegen.

KALISS, 1966, der das Enhancement Phänomen insbesondere untersucht hatte, definierte Enhancement als " die erfolgreiche Induktion des Tumortransplantates und dessen fortschreitendes Wachstum als Folge des Kontaktes zwischen Tumor und spezifischem Antiserum in dem Wirtstier " (Zit. nach ADOLPHS, 1976).

Prinzipiell unterscheidet man vier verschiedene Möglichkeiten, durch die ein Enhancement hervorgerufen werden kann:

1. Die Antigene der Tumorzelle werden durch Antigen - Antikörper - Komplexe besetzt, wodurch die Tumorzelle jedoch nicht zerstört wird. Auf diese Weise werden die Antigene der Tumorzelle maskiert, sie können von Lymphozyten nicht erkannt werden, eine spezifische Stimmulation des Immunsystems bleibt aus (Afferente Blockade).
   Ist bereits die Stimmulation des Immunsystems erfolgt, verhindern die maskierenden Antigen - Antikörper - Komplexe, daß die Immunzellen die Antigene der Tumorzellen erkennen können, eine Zerstörung der Tumorzelle unterbleibt.

   Nach SJÖGREN et al. , 1971, kommt dem Enhancement durch Antigen - Antikörper - Komplexe die größte Bedeutung zu.

2. Die Antigene der Tumorzelle werden durch Antikörper maskiert, welche die Tumorzelle ebenfalls nicht zerstören. Die Auswirkungen sind wie unter 1. beschrieben (BANSAL et al., 1976).
   Nach der allgemein veröffentlichten Auffassung kommt diesem Mechanismus nur eine untergeordnete Rolle zu.

3. Antigen - Antikörper - Komplexe können die Rezeptoren der Immunzellen besetzen und verhindern, daß diese an den Tumorzellen wirksam werden (BANSAL et al., 1976).

4. Freie Antigene können die Rezeptoren der Immunzellen blockieren, bevor die Immunzellen die Tumorzelle erreicht haben, eine Zerstörung der Tumorzelle unterbleibt (BANSAL et al., 1976).

Die freien Antigen aber auch die Antigene in den Antigen - Antikörper - Komplexen werden durch die Tumorzellen produziert und in den Blutstrom freigesetzt.

# 2. DIE BELASTUNG DES MENSCHEN DURCH BLEIVERBINDUNGEN UND IHR EINFLUSS AUF DAS IMMUNSYSTEM

## 2. 1. Blei und Bleiverbindungen als Umweltgifte

Obwohl der gesetzlich erlaubte Zusatz von Bleiverbindungen als Antiklopfmittel zu Vergaserkraftstoffen in den vergangenen Jahren deutlich reduziert wurde, stellen die Abgase der Automobile nach wie vor die Hauptquelle für die Bleibelastung der Umwelt dar.
Dabei handelt es sich in der Hauptsache um Bleichlorid, Bleibromid und Bleioxid, welche beim Verbrennungsvorgang im Motor aus Bleitetraäthyl und Bleitetramethyl entstehen und zum Größtenteil als Schwebstoffe freigesetzt werden (HAAS et al., 1972).

Daraus folgt nicht nur eine Belastung der Luft mit Bleiverbindungen, vielmehr reichern sich diese im Boden und in den Pflanzen an. Die Bleiaufnahme durch die Nahrung ist für den Menschen von großer Bedeutung.

## 2. 2. Die Aufnahme von Blei durch den Menschen

Die Aufnahme von Blei und Bleiverbindungen geschieht im wesentlichen durch pulmonale und enterale Resorption.
Dabei beträgt die enterale Resorption aus der Nahrung etwa 5 - 10 %, was bei einer durchschnittlichen täglichen Bleiaufnahme mit der Nahrung von 300 µg zu einer Bleiaufnahme von etwa 15 - 30 µg pro Tag führt (Zit. nach POTT und BROCKHAUS, 1971). Bei calciumarmer Ernährung oder der Aufnahme von Vitamin D kann die Resorptionsquote 10 % übersteigen, woraus sich eine höhere Gesamtaufnahme errechnet (Zit. nach POTT und SCHLIPKÖTER, 1976).
Die pulmonale Resorptionsquote aus der Atemluft beträgt bis zu 100 %, woraus man, bei einem mittleren Bleigehalt von 2 - 4 µg/$m^3$ Luft, eine tägliche Bleiaufnahme von 10 - 30 µg errechnen kann, wenn man zugrunde legt, daß die retinierte Bleimenge aus dem Atemvolumen etwa 50 % beträgt und das Atem-

volumen pro Tag etwa 10 - 15 $m^3$ Luft (Zit. nach POTT und BROCKHAUS, 1971).
Insgesamt betrachtet, kann man wohl von einer Gesamtaufnahme an Blei von durchschnittlich 30 - 40 µg pro Tag ausgehen. Für beruflich bleiexponierte Personen wie Bleiarbeiter ergeben sich im Tagesmittel Bleiaufnahmen von 100 µg (Zit. nach POTT und SCHLIPKÖTER, 1976).

Die Bleiausscheidung ist normalerweise etwas geringer als die Bleiaufnahme, so daß sich für den Organismus eine positive Bleibilanz ergibt. Ein Teil der retinierten Bleimenge wird an das Hämoglobin der Erytrozyten gebunden. Der größte Teil der retinierten Bleimenge lagert sich in Form eines Depots in den Knochen ab. Aber auch in anderen Organen wird Blei abgelagert, so z. B. in Leber und Nieren (Zit. nach POTT und SCHLIPKÖTER, 1976).

Das Kriterium zur Beurteilung der Bleibelastung ist der Blutbleispiegel. Diese Auffassung wird insbesondere unter anderem auch vertreten in der "Richtlinie des Rates (der Europäischen Gemeinschaft) vom 29. März 1977 über die biologische Überwachung der Bevölkerung auf Gefährdung durch Blei". In dieser Richtlinie werden Referenzwerte für die erwachsene Allgemeinbevölkerung festgelegt, die zur Beurteilung der Überwachungsergebnisse dienen sollen:

≤20 µg Pb/100 ml Blut bei 50 % der Bevölkerung

≤30 µg Pb/100 ml Blut bei 90 % der Bevölkerung

≤35 µg Pb/100 ml Blut bei 100 % der Bevölkerung

Davon abweichend dürfen nur 2 % der untersuchten Stichprobe den Wert von 35 µg Pb/100 ml Blut überschreiten, wobei die Expositionsquellen festzustellen sind.

Unter den heutigen Belastungsbedingungen ergeben sich in den Industriestaaten durchschnittliche Blutbleispiegel von 10 - 20 µg/100 ml Blut (Zit. nach POTT und SCHLIPKÖTER, 1976).

## 2. 3. Der Einfluss von Blei auf das Immunsystem

Die Belastung des Organismus durch Blei und seine Verbindungen hat Wirkungen an den verschiedendsten Organen und Organsystemen, diese sollen hier nicht im einzelnen ausgeführt werden. Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Fragestellung ist jedoch die Wirkung der Bleibelastung auf das Immunsystem. Mehrere Autoren haben hierzu bereits untersuchungen durchgeführt:

### 2. 3. 1. Der Einfluss von Blei auf die Antikörperbildung

KOLLER, 1973, berichtete über signifikant verminderte Antikörpertiter bei Kaninchen, denen er über 70 Tage bleiacetathaltiges Trinkwasser verabreicht hatte.

1974 bestätigten KOLLER und KOVACIC dieses Ergebnis an Mäusen (Swiss Webster). Sie verabreichten den Versuchstieren bleiacetathaltiges Trinkwasser mit drei verschiedenen Bleikonzentrtionen (1375 p.p.m., 137,5 p.p.m., 13,75 p.p.m.) über 56 Tage. Bei allen drei Konzentrationen stellten sie eine signifikant verminderte Antikörperproduktion fest, wobei IgG besonders stark beeinflusst wurde. Als Antikörper wurden Schaferytrozyten verwendet.

Demgegenüber berichteten SCHLIPKÖTER et al.,1976, über einen signifikant erhöhten Antikörpertiter bei NMRI - Mäusen (keine Inzuchttiere), die mit Rinder - Gamma - Globulin oder Human - Serum - Albumin immunisiert wurden, nachdem ihnen über acht Wochen Bleichlorid intraperitoneal injiziert worden war. Dieser Effekt konnte jedoch nicht beobachtet werden, wenn den Tieren das Bleichlorid subcutan gespritzt wurde.

Bei Versuchen an chronisch Blei - exponierten NMRI - Mäusen konnte EWERS, 1980, eine verminderte Infektionsresistenz gegenüber S. typhhimurium feststellen. Bei der Antikörperbestimmung konnte jedoch kein erhöhter Antikörpertiter festgestellt werden.

Im Unterschied zu den bisher genannten Untersuchungen, bei denen die Auswirkungen chronischer Bleiexposition auf die Antikörperbildung untersucht wurden, machen KOLLER et al., 1976, Versuche an Swiss Webster - Mäusen, denen sie oral und intraperitoneal eine einmalige Dosis von 4 mg Blei verabreicht hatten. Nach intraperitonealer Injektion von Schaferytrozyten als Antigen, fanden KOLLER et al. eine hochsignifikante Erhöhung der IgM - Antikörper bei den Tieren, die Blei oral erhalten hatten. Tiere denen Blei intraperitoneal verabreicht wurde, zeigten einen zeitlich verzögerten IgM - Antikörperanstieg, der jedoch ebenfalls hochsignifikant höher war als bei der Kontrollgruppe. Eine Woche nach der ersten Antigengabe verabreichte KOLLER den Versuchstieren erneut Schaferytrozyten. Er stellte fest, daß sowohl bei Tieren die Blei oral erhalten hatten, alsauch bei denen die Blei intraperitoneal erhalten hatten, ein hochsignifikant verringerter IgG - Antikörperanstieg zu verzeichnen war.

### 2. 3. 2. Der Einfluss von Blei auf die Makrophagen

Eine Reihe von Untersuchungen liegen auch über den Einfluß von Blei auf die Makrophagen vor:

BINGHAM et al., 1968, berichteten über Versuche, bei denen Ratten verschieden lang, bis zu einem Jahr, Konzentrationen von 10 µg und 150 µg Blei - Sesquioxid ($Pb_2O_3$) pro Kubikmeter Atemluft inhalierten. Die Tiere wiesen gegenüber einer Kontrollgruppe eine hochsignifikante Verminderung der Alveolarmakrophagen auf, unabhängig davon, ob sie mit der niederigen oder der hohen Blei - Sesquioxid Konzentration belastet worden waren.
BINGHAM stellt darüberhinaus, unter Hinweis auf weitere eigene Untersuchungen, die Behauptung auf, daß bereits eine Belastung der Versuchstiere mit 150 µg Blei - Sesquioxid/$m^3$ Luft über einen Zeitraum von weniger als einer Woche eine maximale Reduktion der Alveolarmakrophagen auslöst.

BECK und MANOJLOVIC berichteten 1972 über Versuche mit Alveolarmakrophagen von Meerschweinchen in der Zellkultur. Sie konnten feststellen, daß ein Zusatz von 3 µg organischer Bleiverbindungen auf $10^6$ Zellen eine Schädigung der Alveolarmakrophagen auslöste (Zit. nach EWERS, 1977).

KAMINSKI et al. veröffentlichten 1977 die Ergebnisse ihrer Untersuchungen an Long - Evans - Inzuchtratten. Die Tiere hatten einmalige intrapulmonale Gaben von 0,25 oder 1,0 mg Bleioxid als Suspension in physiologischer Kochsalzlösung erhalten. Es wurde festgestellt, daß alle bleibelasteten Tiere, insbesondere die 1 mg Bleioxid erhalten hatten, eine signifikante Erhöhung der Zahl der Alveolarmakrophagen aufwiesen. Dabei fiel auf, daß die hohe Bleibelastung insbesondere die Zahl der lebenden Makrophagen erhöhte, während nach Gabe von 0,25 mg Bleioxid insbesondere die toten Makrophagen erhöht gefunden wurden.
Die nachfolgend untersuchte Oberlebenszeit der Alveolarmakrophagen in vitro ergab signifikant verminderte Oberlebenszeiten in beiden Belastungsklassen.

TREJO et al., 1972, fanden bei Ratten und Mäusen eine verminderte Fremdstoffelimination aus dem Blut, nachdem diese eine einmalige Injektion von Bleiacetat erhalten hatten. Die Autoren führen diesen Effekt auf die verminderte Phagozytoseaktivität der Lebermakrophagen zurück (Zit. nach EWERS, 1977).

Demgegenüber kamen KOLLER und ROAN, 1977, bei Untersuchungen zur Phagozytoseaktivität von Peritonealmakrophagen zu anderen Ergebnissen. Sie verabreichten Mäusen der Stämme Swiss Webster und CBA/J über 70 Tage bleiacetathaltiges Trinkwasser mit Bleikonzentrationen von 13, 130, sowie 1300 p.p.m.. Die Peritonealmakrophagen der Versuchstiere wiesen nach hoher Bleibelastung signifikante bis hochsignifikante Erhöhungen der Phagozytoseaktivität auf. Diese wurde gegenüber gewaschenen Schaferytrozyten in vitro getestet.

SCHLIPKÖTER und FRIELER, 1979, stellten bei NMRI - Mäusen nach einstündiger Inhalation von Bleichlorid eine Steigerung der Phagozytose der Alveolarmakrophagen gegenüber

Bakterien fest. Nach einer dreistündigen Expositionszeit konnte diese Beobachtung nicht mehr gemacht werden.

Aus den vorliegenden Arbeiten läßt sich zur Wirkung einer erhöhten Bleibelastung auf die Antikörperbildung sowie die Makrophagen und deren Phagozytoseaktivität kein einheitliches Bild gewinnen.

## 3. BLEIBELASTUNG UND TUMORENTWICKLUNG

Wenn einerseits die Tumorentwicklung einer immunologischen Kontrolle unterliegt und andererseits das Immunsystem durch erhöhte Bleispiegel im Organismus zu beeinflussen ist, so liegt der Gedanke nahe, zu untersuchen, ob eine erhöhte Bleibelastung einen Einfluß auf die Ausbildung oder Entwicklung von Tumoren hat.

Im Jahre 1972 stellten BRUCH, BROCKHAUS und DEHNEN bei Beobachtungen an Rattenlungen fest, daß die Fähigkeit der Alveolarmakrophagen, Benz-(a)-pyren abzubauen, vermindert war, wenn die Tiere einer Exposition mit partikelförmigem Blei ausgesetzt waren (Zit. nach EWERS, 1977).

In der Tat glaubten KOBAYASHI und OKAMOTO, 1974, einen kokarzinogenen Effekt von Bleioxid feststellen zu können, als sie Benz-(a)-pyren und Bleioxid in die Lungen von Syrischen Hamstern instillieren. Bei Tieren die Benz-(a)-pyren und Bleioxid gemeinsam verabreicht bekamen, entwickelten sich atypische Epithelproliferationen und Adenome in den Lungen häufiger als bei Tieren die Benz-(a)-pyren oder Bleioxid alleine erhalten hatten. Darüberhinaus konnte nur in dieser Gruppe das Auftreten eines Adenokarzinoms beobachtet werden.

STONER et al., 1976, untersuchen die kanzerogene Wirkung von Metallverbindungen an Mäusen vom A - Stamm. Sie stellen fest, daß bei intraperitonealer Verabreichung einer sehr hohen Dosis von 150 mg Blei - Subacetat pro Kilogramm Körpergewicht eine gerade noch signifikante karzinogene Wirkung feststellbar war. Die Zahl der Lungentumoren, die bei diesen Tieren spontan auftreten, war vermehrt.

Alle diese Untersuchungen geben jedoch keine eindeutigen Hinweise auf die Wirkung einer Bleibelastung auf die Tumorentwicklung.

## 4. PROBLEMSTELLUNG

Über den Einfluß einer erhöhten Bleibelastung des Organismus auf das Immunsystem liegen, wie gezeigt wurde, bis heute nur wenig einheitliche Erkenntnisse vor.
Über den Einfluß eines erhöhten Blutbleispiegels auf die immunologische Abwehr von Tumoren und damit auf die Entstehung und Ausbildung von Tumoren oder deren Metastasen sind keine gesicherten Erkenntnisse bekannt.

Ausgehend von der Prämisse, daß tumorös entartete Zellen prinzipiell einer Beeinflussung durch das Immunsystem unterliegen können, sollen folgende Fragen beantwortet werden:

Hat ein erhöhter Blutbleispiegel einen Einfluß auf die Ausbildung von Lungenmetastasen, die künstlich durch intravenöse Injektion von syngenischen Tumorzellen erzeugt wurden ?

Wenn ja, wird die Ausbildung der Metastasen gefördert oder behindert ?

# 5. METHODEN UND MATERIALIEN

## 5. 1. Das Versuchsmodel

Den Versuchstieren wurden lebende Tumorzellen intravenös in die Schwanzvene injiziert. Mit dem Blutstrom gelangen diese Zellen in die Lunge, wo sie zum großen Teil in den Kapilaren hängen bleiben und sich festsetzen. Vielen dieser Tumorzellen gelingt es, zu überleben und sich zu einer Metastase zu entwickeln.
Diese Methode wurde bereits in zahlreichen Untersuchungen benutzt, unter Anderen von BASERGA, 1960 und THOMPSON, 1976. Die Beeinflußbarkeit der Metastasenentwicklung in diesem Model konnte durch mehrere Autoren nachgewiesen werden (VAN DEN BRENK et al.,1974; THOMPSON, 1976).

## 5. 2. Die Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten in allen Versuchen A/J - Inzuchtmäuse, die der Zucht von GL. BOMHOLTGARD LTD., 8680 Ry, Denmark entstammen.
Die Tiere hatten bei Lieferung ein Alter von 5 - 6 Wochen und wogen zwischen 18 und 20 Gramm. Alter und Gewicht während der Versuche waren in Vorversuch und Hauptversuch unterschiedlich, da die Tiere für den Hauptversuch über drei Monate lang mit bleiacetathaltigem Futter belastet werden mußten. Die genauen Altersangaben sind bei den Versuchsbeschreibungen angegeben. In jedem Fall wurde streng darauf geachtet, daß alle Tiere innerhalb einer Versuchsreihe so weit wie möglich gleichalterig waren, da insbesondere von THOMPSON, 1976, nachgewiesen wurde, daß bei Inzuchtmäusen, denen er Tumorzellen intravenös injizierte, eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Alter der Versuchstiere und der Zahl der sich ausbildenden Lungenmetastasen bestand.

Es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, da auch ein gewisser Einfluß auf die Metastasenausbildung durch das Geschlecht der Versuchstiere beobachtet worden ist (THOMPSON, 1976).

## 5. 3. Der Tumor

In allen Experimenten wurde der Tumor YAC verwendet, ein durch Moloney - Leukämie - Viren (MLV) in neugeborenen A - Mäusen hervorgerufenes Lymphom (FENYÖ et al., 1977). [1] Dieser für Mäuse vom A - Stamm somit syngenische Tumor wächst sowohl als massiver Tumor, wie auch als Ascites - Tumor, was für die Durchführung der Versuche von besonderer Bedeutung war.
Die Antigenische Struktur dieses Tumors wurde von FENYÖ et al., 1968, 1973, 1974, untersucht und beschrieben.

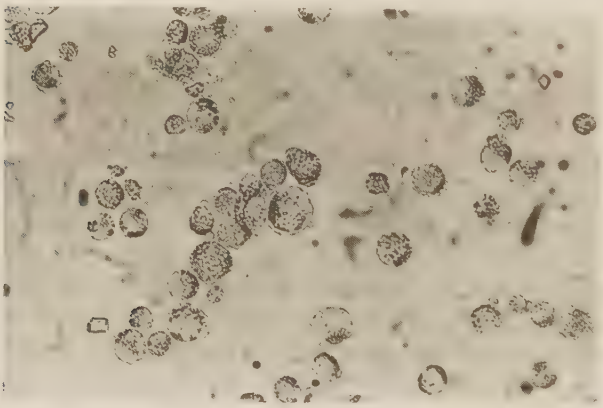


Abbildung 2 : YAC - Tumorzellen unter dem Mikroskop

1) Für die freundliche Oberlassung des Tumors danken wir Herrn Prof. Dr. Eichmann vom Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

Zur Durchführung der Experimente mußten bei der Herstellung der Tumorzellen folgende Voraussetzungen sicher gestellt werden:

1. Zu einem bestimmten Zeitpunkt mußte eine große Menge von Tumorzellen für die Experimente produziert werden, die weitgehend standardisiert waren, insbesondere im Hinblick auf das Passageniveau, das Alter der Tumorzellen im Aszites und den Anteil an toten Zellen.
2. Die Tumorzellsuspension, die den Versuchstieren injiziert werden sollte, mußte möglichst nur einzelne Tumorzellen enthalten, da Zellklumpen besser in der Lungenstrombahn abgefangen werden und aus Zellhaufen sich leichter Metastasen bilden können.

Diese Voraussetzungen wurden auf folgende Weise Erfüllt:

Mehreren Versuchstieren wurden YAC - Tumorzellen intraperitoneal injiziert. Der sich daraufhin entwickelnde sehr Tumorzellreiche Aszites wurde nach 12 Tagen unter sterilen Verhältnissen abpunktiert und anschließend zentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden anschließend in Medium (MEM - Eagle) mit Zusätzen von L - Glutamin, Fetal - Kalbsserum und Antibiotica resuspendiert. Zur Verbesserung der Lagerfähigkeit bei niederigen Temperaturen wurde der Tumorzellsuspension noch einmal die gleiche Menge an Medium mit einem Zusatz von 7 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt.
Die Zellsuspension wurde in Kunststoffröhrchen zu je 3 ml abgefüllt und zunächst für 4 Stunden bei -20°C gelagert, um anschließend endgültig bei - 70°C aufbewahrt zu werden. Diese Technik gewährleistet einen relativ hohen Schutz der lebenden Zellen.
Zur Herstellung der für das Experiment Verwendeten Tumorzellen wurden die eingefrohrenen Zellen zentrifugiert und in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert.
Anschließend wurde diese Tumorzellsuspension A/J - Mäusen intraperitoneal injiziert und der sich daraufhin bildende tumorzellreiche Ascites am 12. Tag unter sterilen Verhältnissen abpunktiert.
Die Anzahl der Tumorzellen pro Milliliter bestimmten wir

mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer - Zählkammer; der Anteil der toten Zellen wurde durch Zugabe von Trypanblau sichtbar gemacht.
Anschließend wurde der tumorzellhaltige Aszites so mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, daß 0,1 ml Flüssigkeit 500000 lebende Tumorzellen enthielten.
Der zusätzliche Anteil toter Tumorzellen betrug im Hauptversuch etwa 1%, in den Vorversuchen etwa 20%.
Die mikroskopische Kontrolle ergab, daß die im Hauptversuch verwendete Tumorzellsuspension vorwiegend aus Einzelzellen bestand und frei von Verklumpungen war; diese Voraussetzung konnte in den Vorversuchen nur annähernd erreicht werden.
Diese Methode erwies sich bezüglich der Herstellung von klumpenfreien Zellsuspensionen einer Trypsinierung massiven Tumormaterials deutlich überlegen.

## 5. 4. Die Erzeugung von Lungenmetastasen

In mehreren Versuchen haben wir ermittelt, daß bei Verwendung des YAC - Tumors in A/J - Mäusen die intravenöse Injektion von 500000 lebenden Tumorzellen zu einer ausreichend großen Zahl an einzelstehenden auszählbaren Metastasen führt.
In allen Versuchen wurde den Versuchstieren jeweils diese Menge an Tumorzellen mit Hilfe einer gut kalibrierbaren Injektionsspritze in die Schwanzvene injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 0,1 ml.

Untersuchungen von ZEIDMAN et al., 1950, haben gezeigt, daß die Anzahl der Lungenmetastasen proportional der Zahl intravenös injizierter lebender Tumorzellen eines transplantabelen Tumors ist.
Von den injizierten lebenden Zellen etwickelt jedoch nur ein kleiner Teil eine Metastase, da der größte Teil der Zellen bereits kurze Zeit nach der Injektion abstirbt.

Nach FIDLER, 1970, der Untersuchungen mit intravenös injizierten Melanomzellen an C 57 BL + 6J - Mäusen vorgenommen hat, gelangen von 200000 injizierten Zellen etra 137000 in die Lunge der Versuchstiere. Von diesen Zellen überleben etwa 1700 dje ersten 24 Stunden; nach 3 Tagen konnten lediglich 450 Zellen nachgewiesen werden.
Es ist anzunehmen, daß sich nicht aus allen überlebenden Zellen eine Metastase entwickelt.

## 5. 5. Die Präparation der Lungen und die Darstellung der Metastasen

Nach Tötung der Versuchstiere, erfolgte die Präparation der Lungen nach einem von WEXLER, 1966, ausgearbeiteten und beschriebenen Verfahren.
Eine Farblösung, bestehend aus 15 % Tinte, 85 % physiologischer Kochsalzlösung und 2 Tropfen Ammoniumhydroxyd pro 100 ml Lösung, wurde nach Eröffnung der Thorax mittels einer Injektionsnadel in die Trachea injiziert, bis die Lungen prall gefüllt und vollständig schwarz angefärbt waren.
Im Anschluß daran wurden die Lungen insgesamt extirpiert und für 24 Stunden in eine Fixierlösung (Fekete´s Solution) gegeben, die aus 100 ml Äthylalkohol (70 Volumenprozent), 10 ml Formalin (30 %) und 5 ml Acetessigsäure (96 %).

Die Metastasen entfärben sich in dieser Fixierlösung und heben sich deutlich als helle Gebilde vom tief schwarzen Lungenparenchym ab (Bild 2 und 3).

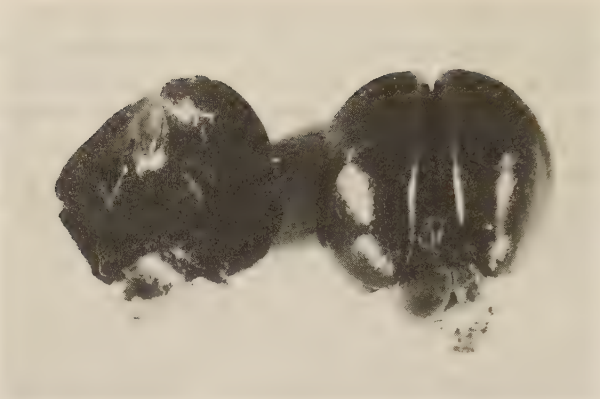


ABBILDUNG 2 : ANGEFÄRBTE LUNGE EINES VERSUCHSTIERES

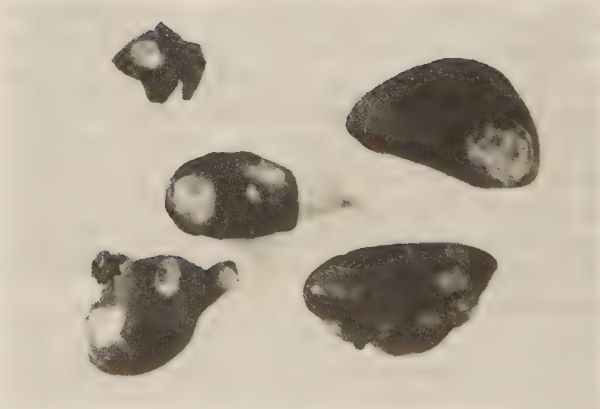


ABBILDUNG 3 : ZERLEGTE LUNGE EINES VERSUCHSTIERES
METASTASEN ENTFÄRBT UND DARGESTELLT

## 5. 6. Die Auswertung der Metastasen

### 5. 6. 1. Die Bestimmung der Metastasen nach Grösse und Zahl

Die präparierten Lungen wurden in ihre fünf Lappen zerlegt, so daß die gesammte Oberfläche der Lunge mit den Metastasen sichtbar wurde.
Mit Hilfe einer Lochschablone aus Plexiglas wurden die Metastasen zehn Größenklassen zugeordnet und die Anzahl der Metastasen in den einzelnen Größenklassen ausgezählt.

Skitze: Lochschablone zur Metastasenbestimmung Masstab 2 : 1

Tabelle: Radien der Grössenklassen

| | |
|---|---|
| Klasse 1 : 0,125 mm | Klasse 6 : 1,25 mm |
| Klasse 2 : 0,25 mm | Klasse 7 : 1,5 mm |
| Klasse 3 : 0,5 mm | Klasse 8 : 1,75 mm |
| Klasse 4 : 0,75 mm | Klasse 9 : 2,0 mm |
| Klasse 5 : 1,0 mm | Klasse 10 : 2,5 mm |

Bei diesem Verfahren wurden nur die an der Oberfläche sichtbaren Metastasen ausgewertet. Einerseits, weil die Metastasen sich nahezu ausschließlich an der Oberfläche befinden, andererseits, weil sich die in der Tiefe des Lungenparenchyms befindlichen Metastasen nicht mit ausreichender Genauigkeit auszählen ließen.

Ein Vergleich der nur an der Oberfläche sichtbaren Metastasen ist möglich, da nur ein sehr kleiner Anteil der Metastasen in der Tiefe des Lungenparenchyms liegt und sich der Auswertung entzieht.
Die Zuverlässigleit dieser Methode wurde durch WEXLER, 1966, geprüft.

### 5. 6. 2. Metastasenflächen als Messwerte

Die Tatsache, daß die Metastasen in ihrer Größe starke Unterschiede aufwiesen, verbot es, allein die Zahl der Metastasen den weiteren Berechnungen zugrunde zu legen.
Da die Metastasen jedoch auch keine kugelförmige Gestalt hatten, konnte das Metastasenvolumen kaum als Meßwert für das gesamte Metastasenaufkommen jedes Tieres dienen. Im Gegenteil, die Metastasen stellten in der Regel zu Oberfläche hin flache Gebilde dar.

Aufgrund dieser Beobachtungen und Oberlegungen sind wir zu der Auffassung gelangt, daß die Berechnung der Gesammtmetastasenfläche eines Tieres aus den Flächen der Einzelmetastasen, am besten den Tumorbefall wiedergibt.

## 5. 7. Die Bleibelastung der Versuchstiere

Zur Erzielung der erforderlichen Blutbleispiegel wurde den Versuchstieren bleiacetathaltiges Futter verabreicht.

Es wurden drei verschiedene Versuchsgruppen von A/J - Mäusen gebildet:

GRUPPE 1 diente als KONTROLLGRUPPE und erhielt Normalfutter ohne Bleizusatz.

GRUPPE 2 erhielt das Futter ALTROMIN 1314 mit einem Zusatz von 300 mg Bleiacetat pro Kilogramm Futter, was nach den Untersuchungen der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt in Kiel vom 5.7.79 einem Bleigehalt von 170 mg/Kg Futter entspricht.

GRUPPE 3 erhielt ALTROMIN 1314 mit einem Bleiacetatzusatz von 3000 mg/Kg Futter, was nach der Analyse einem Bleigehalt von 1700 mg/Kg Futter entspricht.

Alle Versuchstiere erhielten Wasser nach Belieben.

Die Dauer der Bleibelastung betrug bis zur Injektion der Tumorzellen 92 Tage, sie wurde bis zur Tötung der Versuchstiere fortgesetzt.
Der Anfütterungszeitraum wurde so lang gewählt, weil sich, frühestens nach 60 Tagen ein steady - state - level des Blutbleispiegels einstellt (EWERS, 1979).

Die Oberprüfung der Futteraufnahme und der Entwicklung der Tiere wurde durch regelmäßige Gewichtskontrollen der Versuchstiere vorgenommen. Dabei wurde beobachtet, daß die Versuchstiere mit einer hohen Bleibelastung eine deutlich geringere Gewichtsentwicklung aufwiesen als die Tiere ohne eine entsprechende Bleiexposition. Diese Beobachtung wurde bereits in früheren Arbeiten gemacht, so z. B. durch KOLLER, 1973, sowie KOLLER und ROAN, 1977.

Die Versuchstiere hatten zu Beginn der Bleibelastung ein Alter von etwa 5 - 6 Wochen, zum Zeitpunkt der Tumorzellinjektion waren die Tiere 17 -18 Wochen alt.

## 5. 8. Der Blutbleispiegel

Zur Beobachtung der Entwicklung des Blutbleispiegels wurden Blutentnahmen aus dem Sinus retrobulbaris bei den Versuchstieren durchgeführt. Diese erfolgten am 63., 77. und 92. Tag nach dem Beginn der Bleibelastung. Die letzte Messung erfolgte also zum Zeitpunkt der Tumorzellinjektion in die Versuchstiere.

Zur Blutbleibestimmung wurden Blutproben von 2 bis 5 Versuchstieren gepoolt. Die zur Analyse kommenden Blutmengen hatten ein Volumen von ca. 0,5 ml. Diese Menge wurde auf einer Analysenwaage exekt bestimmt und anschließend einer nassen Veraschung unterworfen.
Zur quantitativen Bestimmung wurde das Blei in eine organische Phase extrahiert und mit Hilfe des flammenlosen Atomabsorptionsverfahrens (Graphitrohrverfahren) analysiert.
Die Bleibestimmung wurde im Medizinischen Institut für Umwelthygiene vorgenommen [1].
Aus der Tabelle (Bleigehalt im Blut der Versuchstiere) wird deutlich, daß die Blutbleiwerte der Kontrolltiere in allen Bestimmungen unter unter 2 µg liegen. Bei den bleibelasteten Versuchstieren deutet sich jedoch in beiden Belastungs klassen die Ausbildung eines steady - state - levels an, wobei der Abfall in der mit 300 mg Pb - Acetat pro Kilogramm Futter belasteten Gruppe nicht sinnvoll erklärt werden kann.

Dennoch kann man wohl davon ausgehen, daß sich in der niederig belasteten Gruppe ein Blutbleispiegel von etwa 40 bis 45 µg/100 ml Blut und in der hoch belasteten Gruppe ein Blutbleispiegel von etwas über 100 µg/100 ml Blut ausgebildet wurde.

1) Für Ihre freundliche Unterstützung danke ich Herrn Dr. Brockhaus und Herrn Dr. Ewers.

| Tabelle: Bleigehalt im Blut der Versuchstiere | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Tage nach Beginn der Belastung | Tiergruppe | Zahl der gepoolten Tiere | µg Pb/100 ml Blut | µg Pb/100 ml Blut Mittelwert |
| 63 | Kontrolle | 2 | <2 | |
| 63 | 300 mg Pb- | 2 | 40 | |
| 63 | Acet./Kg | 2 | 44 | 43,9 |
| 63 | Futter | 2 | 47 | |
| 63 | 3000 mg Pb | 2 | 116 | |
| 63 | -Acet./Kg | 2 | 123 | 122,7 |
| 63 | Futter | 2 | 129 | |
| 77 | Kontrolle | 2 | <2 | |
| 77 | 300 mg Pb- | 2 | 45 | |
| 77 | Acet./Kg | 2 | 43 | 44,2 |
| | Futter | | | |
| 77 | 3000 mg Pb | 2 | 78 | |
| 77 | -Acet./Kg | 2 | 108 | 93,2 |
| | Futter | | | |
| 92 | Kontrolle | 4 | <2 | |
| 92 | | 5 | <2 | <2 |
| 92 | | 3 | <2 | |
| 92 | 300 mg Pb- | 3 | 13 | |
| 92 | Acet./Kg | 3 | 23 | 17 |
| 92 | Futter | 2 | 15 | |
| 92 | 3000 mg Pb | 3 | 114 | |
| 92 | -Acet./Kg | 2 | 133,5 | 114,8 |
| 92 | Futter | 2 | 97 | |

## 6. DIE VORVERSUCHE

Um die Beeinflußbarkeit der Metastasenausbildung im verwendeten Versuchsmodel zu prüfen, untersuchten wir die Wirkung von BCG sowie Fluorouracil, einem Pyrimidin - Antagonisten mit tumorhemmender- aber auch immunsuppressiver Wirkung.

Die Versuchstiere hatten zu Begin der Vorversuche ein Gewicht von 18 bis 20 Gramm und waren 5 bis 6 Wochen alt; sie waren keiner Bleiexposition ausgesetzt.

Es wurden drei Versuchsgruppen gebildet:

GRUPPE 1 (Kontrollgruppe)
die Kontrollgruppe bestand aus 24 Versuchstieren, die keiner weiteren Beeinflussung ausgesetzt wurden und lediglich YAC - Tumorzellen injiziert bekamen.

GRUPPE 2 (BCG -Gruppe)
In dieser Gruppe kamen 9 Versuchstiere zur Auswertung. Diese hatten 5 Tage vor Injektion der Tumorzellen je 0,025 ml BCG intraperitoneal injiziert bekommen.

GRUPPE 2 (Fluorouracil - Gruppe)
Den 15 Versuchstieren in dieser Gruppe wurde 5 Tage vor Injektion der Tumorzellen je 0,3 mg Fluorouracil in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Eine solche Dosis Fluorouracil entspricht der auf das Kilogramm Körpergewicht bezogenen Dosis, wie sie therapeutisch beim Menschen angewandt wird, nämlich 15 mg pro Kilogramm Körpergewicht.

11 Tage nach Injektion der Tumorzellen wurden die Versuchstiere getötet und die Lungen nach dem beschriebenen Verfahren präpariert.

# 7. ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE

## 7. 1. DIE ANZAHL DER METASTASEN IN DEN GRÖSSENKLASSEN DIE GESAMMTFLÄCHE DER METASTASEN PRO TIER

Bei der Auswertung der Versuchstierlungen auf das Auftreten von Metastasen hin, wurde die Gesamtfläche aller Metastasen für jedes Tier errechnet.
Dabei ergab sich, daß einige Tiere keine oder auffallend wenige Metastasen entwickelt hatten, andere Versuchstiere hatten , neben einer sonst durchschnittlichen Metastasenentwicklung, einzelne extrem große Metastasen. Die Beobachtung, daß diese Erscheinungen im Hauptversuch unter günstigeren Bedingungen (siehe 5. 3.) und bei größeren Versuchstierzahlen nicht mehr auftraten, hat den Gedanken nahe gelegt, daß es sich um Injektionsfehler bzw. Klumpenbildungen der Tumorzellen gehandelt haben muß.
Um eine Verfälschung der Versuchsergebnisse zu vermeiden, haben wir uns entschlossen, die Versuchstiere, bzw. die Metastasen, bei denen ein technischer Fehler wahrscheinlich war , aus der Auswertung herauszunehmen. So blieben Tiere ohne Berücksichtigung, die weniger als 10 % der durchschnittlichen Metastasenzahl in ihrer Versuchsgruppe aufwiesen. Darüberhinaus wurden Metastasen der Größenklassen 9 und 10, also einzelne ungewöhnlich große Metastasen, nicht gewertet.
Die Veränderungen der Mittelwerte der Metastasengesamtflächen sowie der Versuchstierumfänge sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

TABELLE: KORREKTUR TECHNISCHER FEHLER

| | ORGINAL-UMFANG | KORR. UMFANG | MITTELWERTE UNKORREGIERT | MITTELWERTE KORREGIERT |
|---|---|---|---|---|
| KONTROLLGR. | 24 | 19 | 88,04 | 104,25 |
| BCG - GRUPPE | 9 | 7 | 77,38 | 87,79 |
| FUOROURACIL - GRUPPE | 15 | 12 | 40,73 | 50,36 |

## 7. 2. Mittelwerte der Metastasenflächen
## Standardabweichungen der Mittelwerte
## Vertrauensbereiche der Mittelwerte

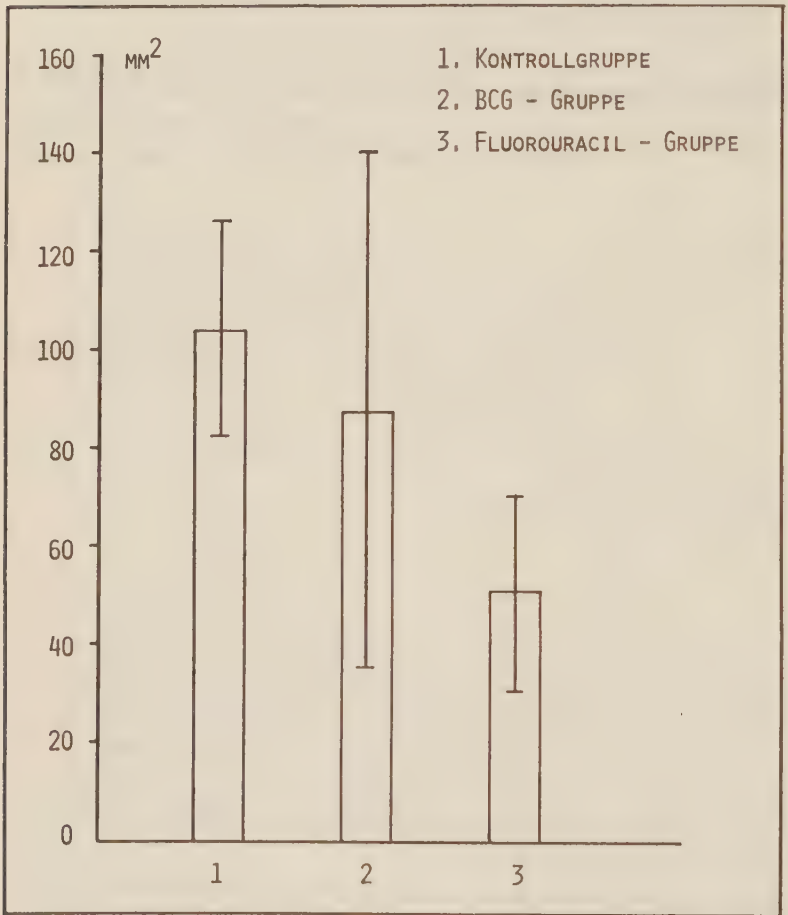
Aus den Gesamtflächen aller Tumoren jedes Tieres wurden die Mittelwerte der Gesamtflächen für jede Versuchstierklasse errechnet.
Um die Verteilung der Meßwerte um den Mittelwert näher zu beschreiben, wurden die Standardabweichungen und die Vertrauensbereiche der Mittelwerte errechnet.

| Gruppe 1 - Kontrollgruppe |
|---|
| Anzahl der Versuchstiere: 19 |
| Mittelwert der Gesamtflächen: 104,25 $mm^2$ |
| Standardabweichung: relativ: 43,54 %<br>absolut: 45,39 $mm^2$ |
| Vertrauensbereich des Mittelwertes: relativ: 21 %<br>absolut: 82,36 - 126,1 |

| Gruppe 2 - BCG - Gruppe |
|---|
| Anzahl der Versuchstiere: 7 |
| Mittelwert der Gesamtflächen: 87,79 $mm^2$ |
| Standardabweichung: relativ: 64,72 %<br>absolut: 56,82 $mm^2$ |
| Vertrauensbereich des Mittelwertes: relativ: 39,31 %<br>absolut: 35,06 - 140,5 |

| Gruppe 3 - Fluorouracil - Gruppe |
| --- |
| Anzahl der Versuchstiere: 12 |
| Mittelwert der Gesamtflächen: 50,36 $mm^2$ |
| Standardabweichung: relativ: 61,72 %<br>absolut: 31,08 $mm^2$ |
| Vertrauensbereich des Mittelwertes: relativ: 39,31 %<br>absolut: 30,56 - 70,16 |

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte und deren Vertrauensbereiche noch einmal im Vergleich graphisch dargestellt.




Graphik: Mittelwerte der Gesamtflächen der Metastasen
Vertrauensbereiche der Mittelwerte

## 7. 3. Vergleich der Mittelwerte

Mit dem STUDENTS T - TEST FOR UNABHÄNGIGE STICHPROBEN wurde getestet, ob die Mittelwerte der Gesamtflächen der Metastasen in den einzelnen Versuchsgruppen signifikant verschieden sind. Die dabei zugrunde gelegte Nullhypothese lautet: Die Mittelwerte der Versuchsgruppen sind gleich.

Der Vergleich aller Mittelwerte miteinander ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen dem Mittelwert der Kontrollgruppe und dem der mit Fluorouracil behandelten Gruppe.

| Students T - Test für unabhängige Vergleiche | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Vergleich der Mittelwerte der Metastasenflächen | | | | | |
| Gruppe | gegen | Gruppe | Freiheitsgr. | Prüfgr. T | Irrt. W. |
| 3 | : | 2 | 17 | 1,873 | 7,57 % |
| 3 | : | 1 | 29 | 3,603 | 0,13 % ! |
| 2 | : | 1 | 24 | 0,767 | 45,62 % |
| Die Mittelwerte von Gruppe 1 und 3 sind signifikant verschieden | | | | | |

## 8. DISKUSSION DER ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE

Die Ergebnisse der Vorversuche, insbesondere der hochsignifikante Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Fluorouracil - Gruppe haben zwei wesentliche Erkenntnisse gebracht:

1. Die Versuchstiere, der Tumor sowie die verwendete Versuchsanordnung haben sich , zur Erzeugung von Lungenmetastasen und deren Auswertung, als tauglich erwiesen.
2. Es ist deutlich geworden, daß die Ausbildung der Metastasen beeinflußbar ist.

Die starke Streuung der Ergebnisse in der mit BCG behandelten Gruppe ist wahrscheinlich nicht nur auf den geringen Stichprobenumfang zurückzuführen. Frühere Untersuchungen, haben gezeigt, daß die Verabreichung von BCG nicht nur im Sinne einer unspezifischen Stimulation des Immunsystems wirkt und lediglich tumorhemmende Wirkungen hat. Vielmehr ist BCG auch in der Lage eine Reaktion im Sinne eines Enhancements auszulösen und damit fördernd auf das Tumorwachstum zu wirken (FUKAWA et al., 1978).

Es ist deshalb möglich, daß die starke Streuung, man könnte auch sagen der Trend zu besonders kleinen oder besonders großen Gesammtflächen, auf die gegensätzliche Wirkung der vorgenannten Phänomäne zurückzuführen ist. In einem solchen Fall ist es nur folgerichtig, wenn ein Vergleich des Mittelwertes mit dem der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied ergibt, da die Ausprägung besonders großer und besonders kleiner Ergebnisse insgesamt den Mittelwert kaum verändern.

## 9. DER HAUPTVERSUCH

Die Frage, die im Hauptversuch beantwortet werden sollte, lautete:
Hat ein erhöhter Blutbleispiegel einen Einfluß auf die immunologische Abwehr i. v. injizierter syngenischer Tumorzellen ?

Beantwortet werden sollte diese Frage in dem bereits beschriebenen Versuchsmodell (5. 1.), anhand der Beeinflußbarkeit der Metastasenbildung aus intravenös injizierten Tumorzellen eines für die Versuchstiere syngenischen Stammes.

Zu diesem Zweck wurden die Versuchstiere in drei Gruppen geteilt:

GRUPPE 1 diente als Kontrollgruppe und erhielt Futter ohne Bleizusatz.

GRUPPE 2 erhielt einen Bleiacetatzusatz von 300 mg pro Kilogramm Futter.
Der Blutbleispiegel betrug zum Auswertungszeitpunkt etwa 17 µg/100 ml Blut.

GRUPPE 3 erhielt einen Bleiacetatzusatz von 3000 mg pro Kilogramm Futter.
Der Blutbleispiegel betrug zum Auswertungszeitpunkt etwa 115 µg/100 ml Blut.

Der Umfang der Versuchsgruppen betrug: GRUPPE 1: 45 Tiere
GRUPPE 2: 40 Tiere
GRUPPE 3: 36 Tiere

# 10. ERGEBNISSE DES HAUPTVERSUCHS

## 10. 1. DIE ANZAHL DER METASTASEN IN DEN GRÖSSENKLASSEN

Die Lungen der Versuchstiere wurden nach dem bereits beschriebenen Verfahren (5. 6.) ausgewertet, die Metastasenzahlen in den einzelnen Größenklassen ausgewertet.

KONTROLLGRUPPE

TABELLE: METASTASENZAHLEN IN DEN GRÖSSENKLASSEN

| TIER NR. | GRÖSSENKLASSEN | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1 | 0 | 7 | 22 | 10 | 11 | 5 | 6 | 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 18 | 29 | 28 | 19 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 4 | 30 | 41 | 12 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 6 | 34 | 44 | 27 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 20 | 53 | 24 | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 2 | 25 | 36 | 19 | 7 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 2 | 78 | 49 | 19 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 36 | 26 | 16 | 7 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 5 | 28 | 47 | 24 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 10 | 19 | 20 | 23 | 11 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 11 | 27 | 35 | 20 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 21 | 47 | 40 | 16 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 5 | 8 | 32 | 20 | 2 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 4 | 24 | 40 | 12 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 6 | 17 | 50 | 14 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 27 | 50 | 45 | 18 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 13 | 43 | 33 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 5 | 28 | 23 | 10 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 8 | 27 | 22 | 3 | 4 | 2 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 3 | 5 | 11 | 14 | 5 | 3 | 2 | 0 | 0 |

KONTROLLGRUPPE — FORTSETZUNG

| TIER NR. | GRÖSSENKLASSE | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 21 | 0 | 1 | 7 | 18 | 20 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 14 | 50 | 39 | 26 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 0 | 5 | 47 | 48 | 24 | 8 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 5 | 18 | 43 | 14 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 33 | 25 | 29 | 10 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 0 | 6 | 51 | 77 | 32 | 6 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | 0 | 0 | 6 | 33 | 25 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 0 | 1 | 5 | 60 | 24 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | 0 | 1 | 25 | 42 | 29 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 0 | 3 | 17 | 56 | 26 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | 0 | 2 | 27 | 49 | 31 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 32 | 0 | 1 | 6 | 18 | 18 | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 33 | 0 | 0 | 10 | 34 | 41 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 0 | 0 | 10 | 26 | 11 | 6 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 35 | 0 | 2 | 17 | 52 | 27 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 0 | 0 | 34 | 32 | 14 | 8 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 37 | 0 | 0 | 43 | 25 | 21 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 38 | 0 | 0 | 35 | 38 | 18 | 8 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 39 | 0 | 0 | 1 | 35 | 39 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 40 | 0 | 0 | 10 | 49 | 39 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 41 | 0 | 4 | 5 | 30 | 18 | 8 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 42 | 0 | 6 | 19 | 43 | 27 | 9 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 43 | 0 | 1 | 20 | 73 | 32 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 44 | 0 | 0 | 5 | 45 | 27 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 45 | 0 | 7 | 30 | 31 | 23 | 6 | 0 | 1 | 0 | 0 |

| Versuchsgruppe mit 300 mg Bleiacetat pro Kg Futter | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tabelle: Metastasenzahlen in den Grössenklassen | | | | | | | | | | |
| Tier Nr. | Grössenklasse | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1 | 0 | 12 | 65 | 32 | 10 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 23 | 57 | 22 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 9 | 38 | 48 | 12 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 3 | 14 | 37 | 15 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 15 | 17 | 17 | 7 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 3 | 34 | 44 | 11 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 6 | 17 | 53 | 16 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 31 | 29 | 37 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 5 | 25 | 34 | 14 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 3 | 25 | 22 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 12 | 42 | 27 | 14 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 26 | 38 | 29 | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 24 | 48 | 20 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 5 | 24 | 44 | 23 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 19 | 15 | 7 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 2 | 35 | 38 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 3 | 46 | 32 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 2 | 21 | 27 | 10 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 20 | 23 | 15 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 20 | 48 | 27 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 6 | 16 | 10 | 8 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 9 | 35 | 17 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 0 | 7 | 23 | 31 | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 16 | 47 | 14 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 14 | 38 | 18 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 0 | 26 | 31 | 26 | 6 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | 0 | 15 | 34 | 17 | 7 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 0 | 5 | 13 | 17 | 12 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | 0 | 19 | 32 | 8 | 9 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 0 | 7 | 53 | 25 | 5 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | 0 | 21 | 43 | 15 | 9 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 32 | 0 | 9 | 46 | 16 | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 33 | 0 | 2 | 8 | 19 | 7 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 0 | 7 | 25 | 17 | 12 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 35 | 0 | 8 | 33 | 28 | 10 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 0 | 39 | 43 | 26 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 37 | 0 | 6 | 21 | 25 | 14 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 38 | 0 | 2 | 2 | 8 | 15 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 39 | 0 | 31 | 48 | 9 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 40 | 0 | 18 | 21 | 10 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Versuchsgruppe mit 3000 mg Bleiacetat pro Kg Futter

Tabelle: Metastasenzahlen in den Grössenklassen

| Tier Nr. | Grössenklasse 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 19 | 19 | 9 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 1 | 5 | 16 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 31 | 25 | 14 | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 10 | 26 | 35 | 9 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 25 | 25 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 20 | 34 | 34 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 25 | 33 | 12 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 20 | 37 | 26 | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 6 | 33 | 41 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 22 | 19 | 7 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 2 | 25 | 29 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 17 | 32 | 22 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 2 | 7 | 35 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 11 | 38 | 25 | 10 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 19 | 32 | 33 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 8 | 15 | 9 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 6 | 16 | 15 | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 7 | 22 | 6 | 5 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 11 | 37 | 19 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 10 | 40 | 19 | 7 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 13 | 34 | 19 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 37 | 29 | 14 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 0 | 3 | 19 | 21 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 11 | 8 | 9 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 8 | 15 | 14 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 0 | 19 | 33 | 13 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | 0 | 24 | 9 | 3 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 0 | 20 | 33 | 15 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | 0 | 29 | 17 | 7 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 0 | 16 | 19 | 21 | 6 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | 0 | 18 | 20 | 20 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 32 | 0 | 7 | 8 | 9 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 33 | 0 | 3 | 19 | 21 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 0 | 0 | 3 | 29 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 35 | 0 | 16 | 34 | 7 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 0 | 25 | 27 | 19 | 12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

## 10. 2. Die Gesamtfläche der Metastasen pro Tier

Aus der Anzahl der Metastasen in den einzelnen Größenklassen wurde, wie bereits beschrieben, die Gesamtfläche aller Metastasen pro Tier errechnet.

Die Gesamtflächen für alle Tiere in den drei Versuchsgruppen sind in den nachfolgenden Tabellen nach der Flächengröße geordnet aufgeführt.

Tabelle: Gesamtfläche aller Metastasen pro Tier im Vergleich

Flächenangaben in $mm^2$

| Kontrollgruppe | Gruppe mit 300 mg Pb-Acet./Kg Futter | Gruppe mit 3000 mg Pb-Acet./Kg Futter |
|---|---|---|
| 124,29 | 52,03 | 34,56 |
| 131,95 | 64,6 | 41,82 |
| 132,93 | 71,27 | 42,22 |
| 142,75 | 82,27 | 48,11 |
| 146,08 | 87,96 | 48,5 |
| 147,46 | 89,73 | 52,62 |
| 157,87 | 90,91 | 55,76 |
| 162,18 | 91,7 | 58,32 |
| 167,29 | 93,66 | 59,1 |
| 175,54 | 96,41 | 60,87 |
| 178,29 | 97,59 | 64,99 |
| 180,64 | 98,96 | 65,19 |

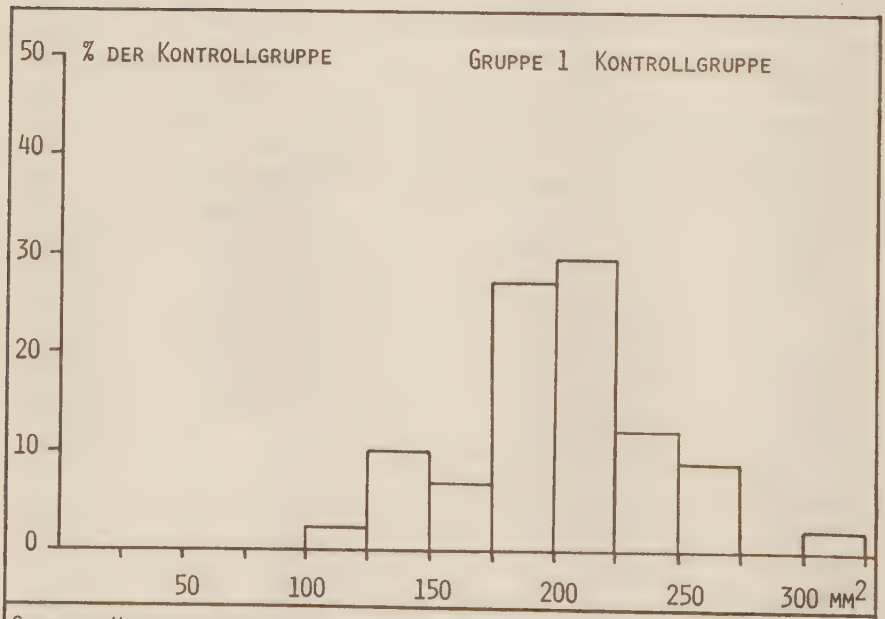
Tabelle: Gesamtflächen aller Metastasen pro Tier im Vergleich

Fortsetzung

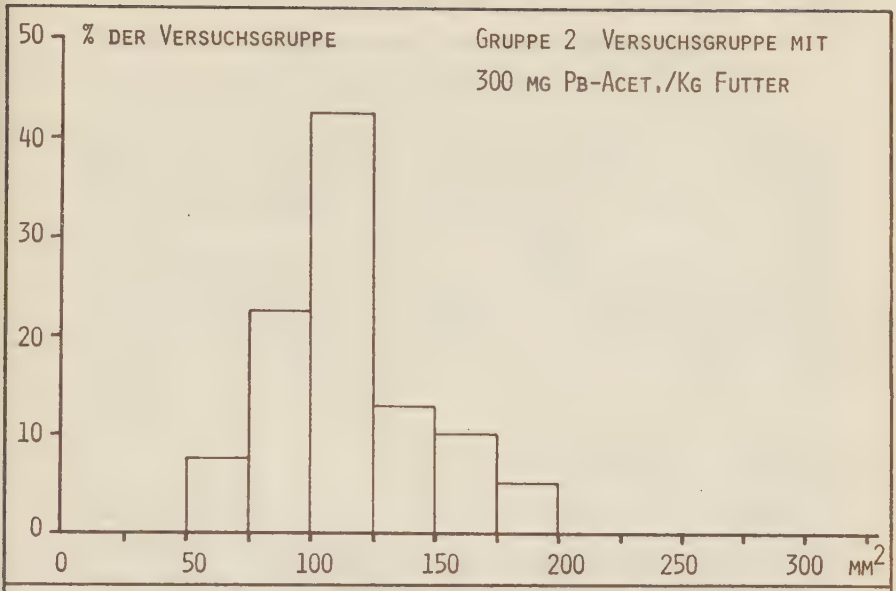
| Kontrollgruppe | Gruppe mit 300 mg Pb-Acet./Kg Futter | Gruppe mit 3000 mg Pb-Acet./Kg Futter |
|---|---|---|
| 181,23 | 104,07 | 66,76 |
| 182,41 | 104,46 | 70,88 |
| 184,37 | 104,65 | 72,06 |
| 185,35 | 104,85 | 72,26 |
| 188,89 | 105,64 | 72,26 |
| 191,05 | 107,01 | 74,22 |
| 194,98 | 107,4 | 74,42 |
| 195,56 | 109,96 | 74,61 |
| 199,69 | 110,94 | 76,58 |
| 200,67 | 112,7 | 83,84 |
| 204,6 | 113,29 | 84,43 |
| 205,19 | 118,4 | 86,79 |
| 205,19 | 118,6 | 86,98 |
| 211,08 | 119,77 | 88,75 |
| 214,41 | 120,56 | 97,59 |
| 217,16 | 123,11 | 99,75 |
| 217,16 | 124,68 | 102,3 |
| 218,73 | 126,45 | 102,69 |
| 219,13 | 135,28 | 103,67 |
| 219,52 | 136,86 | 109,56 |
| 219,91 | 138,82 | 121,15 |
| 221,29 | 139,41 | 122,33 |
| 228,16 | 154,33 | 122,33 |
| 236,01 | 165,92 | 129,98 |
| 236,8 | 173,18 | |
| 237,19 | 174,75 | |
| 238,56 | 176,32 | |
| 241,51 | 178,68 | |
| 253,68 | | |
| 258,59 | | |
| 265,07 | | |
| 267,62 | | |
| 321,42 | | |

## 10. 3. Die Häufigkeitsverteilung der Gesamtflächen innerhalb der Versuchsgruppen

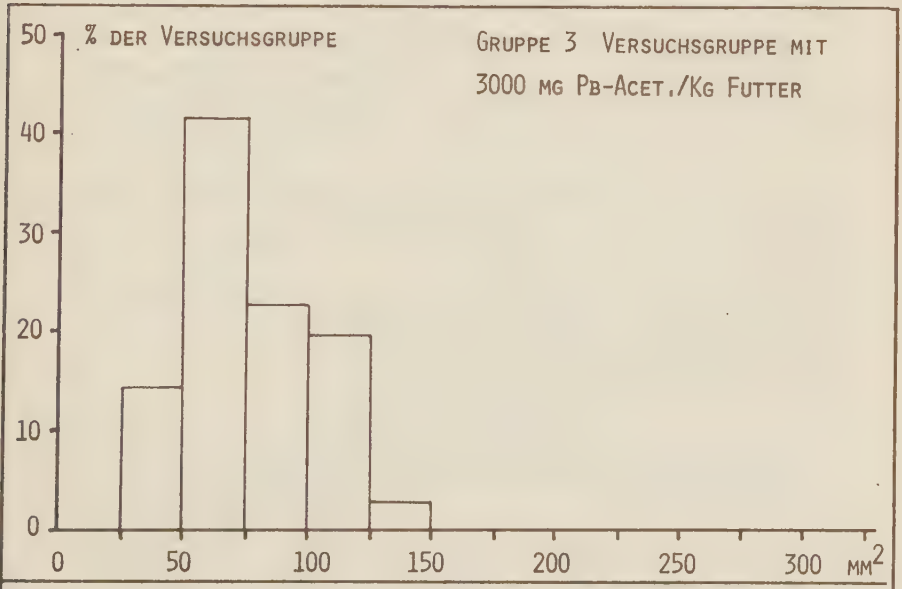
Zur Verdeutlichung der Verteilung der Metastasengesammtflächen um einen Mittelwert wurden Intervalle mit einem Abstand von 25 $mm^2$ gebildet und errechnet, wie viel Prozent aller Tiere einer Versuchsgruppe in jedes Intervall fallen.
Dabei wurde eine Tendenz zur Normalverteilung um einen Mittelwert deutlich.
Offensichtlich verringern sich die Gesamtflächen der Metastasen bei den bleibelasteten Versuchstieren gegenüber denen der Kontrollgruppe.




Graphik: Häufigkeitsverteilung der Gesamtflächen aller Metastasen




GRAPHIK: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER GESAMTFLÄCHEN DER METASTASEN




GRAPHIK: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER GESAMTFLÄCHEN ALLER METASTASEN

## 10. 4. Mittelwerte der Metastasenflächen
## Standardabweichungen der Mittelwerte
## Vertrauensbereiche der Mittelwerte

Zur Ermittlung der durchschnittlichen Metastasenfläche in jeder Versuchsgruppe, wurden die arithmetischen Mittelwerte der aus den einzelnen Metastasenflächen errechnet.

Um die Verteilung der Meßwerte um die Mittelwerte näher zu charakterisieren, wurden die Standardabweichungen und die Vertrauensbereiche der Mittelwerte errechnet. Der Vertrauensbereich der Mittelwerte wurde im 95 % Intervall bestimmt.

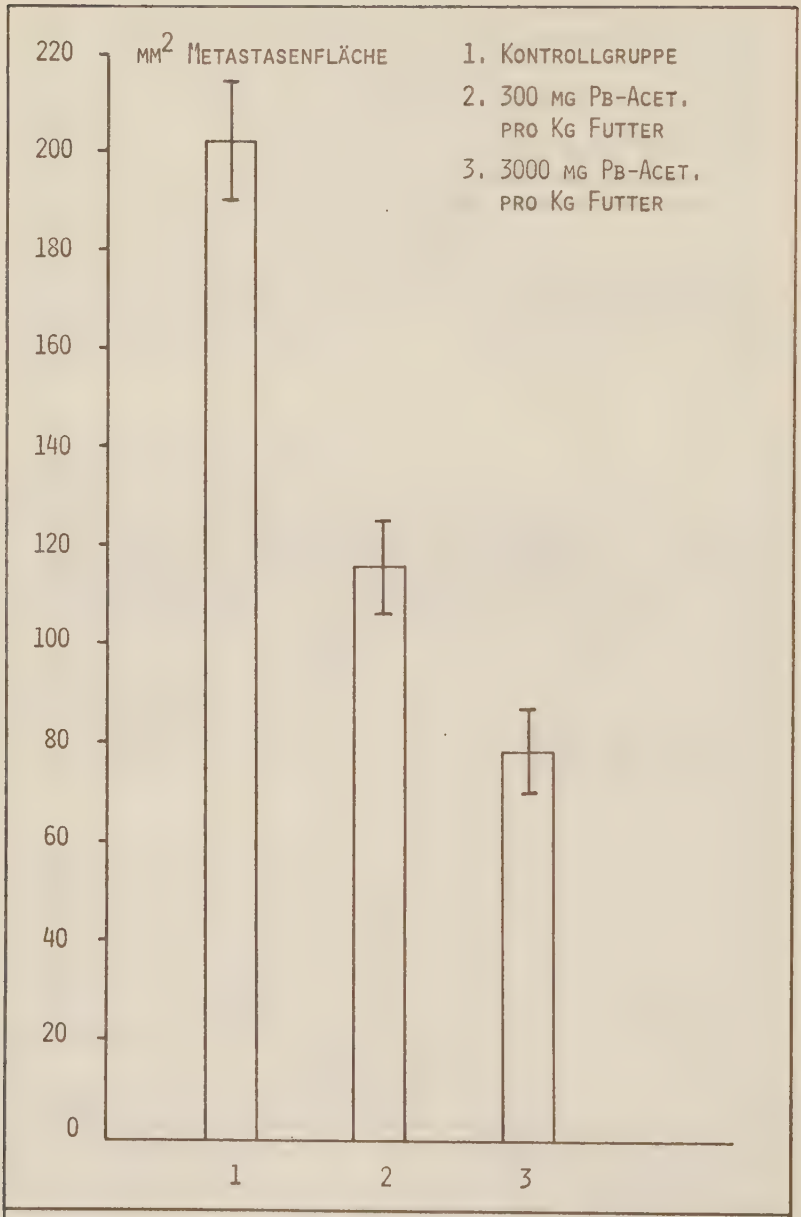
| Gruppe 1 - Kontrollgruppe | |
|---|---|
| Anzahl der Versuchstiere: 45 | |
| Mittelwert der Gesamtflächen : 202,432 $mm^2$ | |
| Standardabweichung: | Relativ: 19,9 %<br>absolut: 40,30 $mm^2$ |
| Vertrauensbereich des Mittelwertes: (95 % Intervall) | relativ: 6 %<br>absolut: 190,34 bis 214,52 $mm^2$ |

| Gruppe 2 - 300 mg Pb - Acetat/Kg Futter | |
|---|---|
| Anzahl der Versuchstiere: 40 | |
| Mittelwert der Gesamtflächen : 115,679 $mm^2$ | |
| Standardabweichung: | relativ: 26 %<br>absolut: 30,10 $mm^2$ |
| Vertrauensbereich des Mittelwertes: (95 % Intervall) | relativ: 8,3 %<br>absolut: 106,06 bis 125,3 $mm^2$ |

| Gruppe 3 - 3000 mg Pb - Acetat/Kg Futter |
|---|
| Anzahl der Versuchstiere: 36 |
| Mittelwert der Gesamtflächen: 78,562 $mm^2$ |
| Standardabweichung: relativ: 31,6 %<br>absolut: 24,85 $mm^2$ |
| Vertrauensbereich des Mittelwertes: relativ: 10,7 %<br>(95 % Intervall) absolut: 70,16 bis 86,96 $mm^2$ |

Da die Mittelwerte der Versuchsgruppen stark voneinander abweichen und sich die Vertrauensbereiche der Mittelwerte nicht überschneiden, darf bereits die Vermutung geäußert werden, daß durch die Belastung der Versuchstiere mit Bleiacetathaltigem Futter eine Beeinflussung der Meßwerte eingetreten ist.

Die nachfolgende Graphik macht den Einfluß auf die Mittelwerte der Gesammtflächen der Metastasen in der Gegenüberstellung noch einmal besonders deutlich.




Graphik: Mittelwerte der Gesamtflächen der Metastasen
Vertrauensbereiche der Mittelwerte

## 10. 5. Bartlett - Test auf Varianzgleichheit
## F - Test

Ob die Varianzen der Stichproben homogen sind, wurde mit dem Bartlett - Test untersucht.
Es ergab sich, daß die Varianzen nicht ganz homogen sind, wenn man eine Signifikanzschwelle von 1 % oder 5 % annimmt. Der errechnete Chi - Quadrat - Wert von 9,358 ist jedoch nur schwach größer als der Tabellenwert von 9,21 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %. Da jedoch die Werte sehr dicht beieinander liegen, kann man den F - Test mit Vorbehalt akzeptieren. Dies gilt insbesondere, wenn man die starke natürliche Schwankung bedenkt, die sich aus dem biologischen Ausgangsmaterial ergibt. Der Vorbehalt bestünde darin, einen errechneten F - Wert in der Nachbarschaft eines Tabellenwertes vorsichtig zu interpretieren. Hier jedoch wurde deutlich, daß die Streuung zwischen den Stichproben von der Streuung innerhalb der Stichproben verschieden ist.
Die Stichprobenmittelwerte sind signifikant verschieden.

| Bartlett - Test auf Varianzgleichheit | | |
|---|---|---|
| Chi - Quadrat: 9, 358 | FG: 2 | I. W.: 0,93 % |
| Die Stichprobenvarianzen sind signifikant verschieden | | |

| F - Test | | |
|---|---|---|
| F: 153,325 | FG zwischen Stichproben: 2<br>FG innerhalb Stichproben: 118 | I.W. $<$ 0,01 % |
| Die Stichprobenmittelwerte sind signifikant verschieden | | |

## 10. 6. Vergleich der Mittelwerte

Um zu Überprüfen, ob die Mittelwerte der Metastasenflächen in den verschiedenen Versuchsgruppen signifikant voneinander abweichen, wurde der STUDENTS t - TEST FÜR UNABHÄNGIGE VERGLEICHE durchgeführt.
Die Nullhypothese lautete: Die Mittelwerte der Versuchsgruppen sind gleich.

Die Berechnungen ergaben, daß die Nullhypothese mit einer Irrzumswahrscheinlichkeit von $<0{,}01$ in allen Fällen zu verwerfen ist.
Daraus folgt, daß zwischen allen Mittelwerten ein hochsignifikanter Unterschied besteht.

| Students T - Test für unabhängige Vergleiche | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Vergleich der Mittelwerte der Metastasenflächen | | | | |
| Gruppe | gegen | Gruppe | Freiheitsgr. | Prüfgr. T | Irrt. W. |
| 3 | : | 2 | 74 | 5,823 | $<0{,}01$ ! |
| 3 | : | 1 | 79 | 16,138 | $<0{,}01$ ! |
| 2 | : | 1 | 83 | 11,128 | $<0{,}01$ ! |
| Die Mittelwerte aller Versuchsgruppen sind signifikant voneinander verschieden | | | | |

## 11. DISKUSSION DER ERGEBNISSE DES HAUPTVERSUCHS

Wie bereits gezeigt wurde, reduziert die Bleibelastung der Versuchstiere die Metastasenbildung signifikant. Dabei ist von besonderer Bedeutung, daß nicht nur extrem hohe Dosen einen signifikanten Einfluß ausüben, sondern sogar Dosen, die für stark belastete Menschen durchaus erreichbar sind.

Diese Beobachtungen werfen die Frage nach dem Mechanismus dieses Effekts auf:
Dabei ist zunächst eine unmittelbar toxische Wirkung auf die Tumorzelle nicht auszuschließen. Es ist bekannt, daß Blei in der Lage ist Zellen zu schädigen, somit sollte es auch denkbar sein, daß Blei eine toxische Wirkung auf die Tumorzellen ausüben kann.
Da der Einfluß auf die Tumorausbildung jedoch bereits bei mittelhohen Blutbleispiegeln hochsignifikant war, ist eine Wirkung über diesen Mechanismus unwahrscheinlich.

In erster Linie kommt für die Erklärung der Ergebnisse eine Beeinflussung immunologischer Mechanismen durch die Bleibelastung in Frage. Dabei ist für die Interpretation die Unterteilung der immunologischen Funktionen in einen zellulären und einen humoralen Anteil, sowie die Differenzierung von besonderer Bedeutung.
In vivo durchgeführte Studien zeigen in ihren Ergebnissen immer das Resultat der Zusammenarbeit aller immunologischen Einflussgrößen, eine isolierte Antwort einzelner Komponenten gibt es nicht. Welche Faktoren der Immunantwort im Einzelfall überwiegen, hängt unter anderem ab:

1. Vom Stoff welcher die Immunantwort induziert, beziehungsweise dessen biologischer und chemischer Reaktion mit dem Körper.
2. Von der Größe der Dosis des Stoffes, der die Immunantwort auslöst, sowie der Applikationsart.
3. Von der Dauer der Stimuliert des Immunsystems.
4. Von der genetischen Ausrüstung der Versuchstiere.
5. Von den immunbiologischen Eigenschaften des Antigens.

Nachfolgend sollen die theoretischen Möglichkeiten der Beeinflussung des Tumorwachstums durch die Bleibelastung aufgezeigt werden, ohne daß eine gesicherte Aussage darüber gemacht werden könnte, welcher Mechanismus für das Resultat der Untersuchungen die entscheidende Bedeutung hat:

1. Wirkung von Blei auf Makrophagen.

   Wie bereits oben gezeigt wurde ist Blei in vivo und in vitro in der Lage Makrophagen zu schädigen.
   Aber auch über eine Stimulation der Makrophagentätigkeit wurde bereits berichtet (2. 3. 2.). Möglicherweise liegt dem Stimulationsmechanismus die Bildung eines Blei - Proteinkomplexes zugrunde, der unspezifisch stimulierend auf das Immunsystem wirkt.
   Die Verbesserung oder Verschlechterung der Lebensbedingungen des Tumor hängen vom Oberwiegen eines Mechanismusses ab.

2. Einfluß von Blei auf die N - Killer - Zellen.

   Sehr schnell nach der Transformation einer Zelle in eine Tumorzelle sind die N - Killer - Zellen in der Lage eine Antigenänderung dieser Zellen zu erkennen. In einer unspezifischen Reaktion werden die Tumorzellen abgetötet.
   Werden die N - Killer - Zellen durch Blei geschädigt, ergibt sich für den Tumor eine erhöhte Chance zu schnellem Wachstum, werden die Zellen jedoch durch Bleikomplexe stimuliert, ergeben sich schlechtete Wachstumsbedingungen.

3. Einfluß von Blei auf die T - Zellen.

   Den T - Zellen kommt die zentrale Rolle bei der Bekämpfung des Tumors zu. Dabei unterscheidet man, wie bereits ausführlich beschrieben (1. 4.), Effektor - T - Zellen, die sich zu einem Klon den Tumor spezifisch schädigender Zellen differenzieren, sowie die Helfer - T - Zellen, welche B - Zellen zur Bildung von Antikörpern anregen.
   Die Schädigung der T - Zellen durch eine toxische Wirkung von Blei ist vorstellbar. Die Beschädigung der Effektor - T - Zellen würde dabei die Wachstumsmöglichkeiten des Tu-

mors verbessern, die fehlende Stimulation der B - Zellen durch Schädigung der Helfer - T - Zellen würde hingegen eher dem Tumorwachstum nützen, da auch die Bildung von Enhancing - Antikörpern unterdrückt wird.
Es ist aber ebenso denkbar, daß sich Blei an Tumorassoziierte Transplantationsantigene (TATA) bindet und somit die Immunogenität der Antigene erhöht.
In diesem Fall würden die T - Zellen stärker stimuliert was eine erhöhte Wirkung der Effektor - T - Zellen zur Folge haben dürfte, jedoch auch eine Stimulation der Produktion von Enhancing - Antikörpern durch B - Zellstimmulation ist möglich.
Die Wirkung auf den Tumor durch diesen Mechanismus hängt vom Oberwiegen der einzelnen Faktoren ab.

4. Einfluß von Blei auf die Suppressor - T - Zellen.

Suppressor - T - Zellen sind sowohl in der Lage die Aktivität der Effektor - T - Zellen alsauch die der B - Zellen zu beschränken. Werden die Suppressor - T - Zellen durch Blei geschädigt, kommt es zu einer verstärkten Reaktion der Effektor - T - Zellen aber auch zu einer Stimulierung der B - Zellen und damit der Antikörperproduktion.
Bei einer Stimulation der Suppressor - T - Zellen ergeben sich umgekehrte Effekte.

5. Einfluß von Blei auf die B - Zellen.

Die B - Zellen bilden unter dem Einfluß der Helfer - T - Zellen Antikörper, wobei es zur Produktion von gegensätzlich wirksamen Antikörpern kommt. Einerseits können zytotoxische Antikörper produziert werden, die die Tumorzelle unmittelbar schädigen können. Andererseits können sogenannte Enhancing - Antikörper gebildet werden, die über die bereits ausführlich beschriebenen Vorgänge (1. 5. 8.) das Tumorwachstum begünstigen (KOLDOVSKY, 1969).
Von diesen beiden Mechanismen kommt dem letzteren jedoch wahrscheinlich die erheblich überwiegende Bedeutung zu.
Eine Schädigung der B - Zellen durch Blei dürfte demzufolge das Tumorwachstum eher behindern als fördern. Eine mög-

liche Stimulation der B - Zellen über die bereits diskutierten Mechanismen müßte eine entgegengesetzte Wirkung haben.

Alle vorgenannten Mechanismen sind in ihren Auswirkungen auf das Tumorwachstum noch einmal in nachstehender Tabelle zusammenfassend skiziert.

Selbstverständlich sind noch weitere Einflußnahmen von Blei auf den Organismus und die Ausbildung des Tumorwachstums möglich, wie z. B. hormonelle Einflüsse, Beeinflussung verschiedener metabolischer Mechanismen, Schädigung von Leber und Nieren mit Stoffwechselwirkungen, Schädigung des Knochenmarks etc., diese sollten jedoch an dieser Stelle nicht diskutiert werden.

Zieht man die Ergebnisse der parallel zur vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen von GULAREK et al., die den Einfluß von Blei auf die zellvermittelte Immunität in vitro untersucht haben, zur Interpretation zu Hilfe, so ergeben sich folgende Erkenntnisse:

1. Die Tatsache, daß das Wachstum von Tumorzellen auch in vitro durch Zugabe von Immunzellen aus bleibelasteten Mäusen gehemmt werden kann, deutet auf die besonders wichtige Rolle der zellulären Funktionen bei der Tumorabwehr.
2. Da ein tumorhemmender Einfluß von Immunzellen aus bleibelasteten Versuchstieren auch in vitro nachweisbar ist, wird es sehr wahrscheinlich, daß den Beobachtungen immunologische Phänomäne zugrunde liegen.

Von allen in vivo wirksamen Mechanismen erscheinen uns die Beschädigung der Suppressor - T - Zellen und der B - Zellen am wahrscheinlichsten. Natürlich wird auch die unspezifische Stimmulation der N - Killer - Zellen und der Makrophagen eine erhebliche Rolle spielen.
Alle Mechanismen, ob sie das Tumorwachstum hemmen oder fördern, können nebeneinander wirksam sein, der endgültig feststellbare Effekt wird entscheidend vom Obergewicht einzelner Faktoren abhängen.

Tabelle: Theoretisch mögliche Wirkungen von Blei auf das Immunsystem und ihre Auswirkungen auf das Tumorwachstum.

| Einfluss von Blei auf: | Wirkung der Beeinflussung | Auswirkung auf Tumorwachstum |
|---|---|---|
| Tumorzelle (unmittelbar) | Toxische Wirkung | ↓ |
| Makrophagen | Stimulation | ↓ |
| | Hemmung | ↑ |
| N - Killer - Zellen | Stimulation | ↓ |
| | Hemmung | ↑ |
| Effektor - T - Zellen | Stimulation | ↓ |
| | Hemmung | ↑ |
| Helfer - T - Zellen | Stimulation | ↑ |
| | Hemmung | ↓ |
| Suppressor - T - Zellen (Wirkung auf T - Zellen) | Stimulation | ↓ |
| | Hemmung | ↑ |
| Suppressor - T - Zellen (Wirkung auf B - Zellen | Stimulation | ↓ |
| | Hemmung | ↑ |
| B - Zellen (Enhancing Antikörper | Stimulation | ↑ |
| | Hemmung | ↓ |
| B - Zellen (Zytotoxische Antikörper) | Stimulation | ↓ |
| | Hemmung | ↑ |

Nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit veröffentlichten KERKVLIET, KOLLER et al., 1979, eine Untersuchung, in der sie den Einfluss einer chronischen Belastung mit Kadmium auf die Entwicklung eines Tumors an Mäusen untersuchen.
Sie stellen fest, daß eine Belastung mit hohen Gaben Kadmium ( 300 p.p.m.) im Trinkwasser die Entwicklung des Tumorwachstums hemmt. Man interpretiert das Ergebnis mit einer Verminderung der zellvermittelten Immunität der Versuchstiere.

## 12. ZUSAMMENFASSUNG

Mäuse vom Stamme A/J erhielten über 13 Wochen Futter mit einem Zusatz an Bleiacetat von 300 mg oder 3000 mg pro Kilogramm Futter.
Anschließend wurden den Tieren 500000 lebende YAC - Tumorzellen, einem für A/J - Mäuse syngenischen Tumor, intravenös in die Schwanzvene injiziert.
Die Lungen der Versuchstiere wurden nach 9 Tagen auf Metastasen hin untersucht. Beide bleibelasteten Gruppen wiesen gegenüber einer nichtbelasteten Kontrollgruppe, die ebenfalls YAC - Zellen injiziert bekommen hatte, eine hochsignifikant verminderte Metastasenbildung auf. Dieser Effekt war bei der mit 3000 mg Bleiacetat pro Kg Futter belasteten Gruppe besonders stark.
Dieses Ergebnis wird vor allem auf einen Einfluß der Bleiionen auf das Immunsystem zurückgeführt. Es wird die Hypothese vertreten, daß durch Schädigung von Suppressorsystemen die zelluläre Immunreaktion erhöht wird.

## 13. LITERATURANGABEN


ADOLPHS, H. D.
Immunologische Faktoren beim Wachstum maligner Tumoren.
Med. Klinik 71 (1976), 353 - 364.

BALDWIN, R. W.
Tumor - specific antigens associated with chemically induced tumors.
Rev. Eur. Etud. Clin. Biol. 15 (1970), 593.

BANSAL, S. C.
BANSAL, B. R.
BOLAND, J. P.
Blocking and unblocking serum factors in neoplasia.
Current Topics in Microbiol. and Imm. 75 (1976), 45 - 76.

BASERGA, R.
PUTONG, P. B.
TYLER, S.
WARTMAN, W. B.
The dose - response realationship between the number of embolic tumor cells and the incidence of blood - borne metastases.
Br. J. Cancer 14 (1960), 173.

BECK, E. G.
MANOJLOVIC, H.
Blei
Lufthygiene und Silikoseforschung Jahresber. 5 (1972), 34 - 41.

BINGHAM, E.
PFITZER, E. A.
BARKLEY, W.
RADFORD, E. P.
Alveolar macrophages: Reduced number in rats after prolonged inhalation of lead - sesquioxide.
Science 162 (1968), 1297 - 1299.

BURNET, F. M.
The concept of immunological surveillance.
Progr. exp. Tumor Res. 13 (1970), 1.

EWERS, U.
Wirkungen von Blei auf das Immunsystem.
Lufthygiene und Silikoseforschung Jahresber. 10 (1977), 179 - 190.

EWERS, U. Persönliche Mitteilung (1979).

EWERS, U.
WEISSER, L.
WEGNER, A. Einfluß einer chronischen Bleibelastung auf die Infektionsresistenz.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Org. B 170 (1980), 397 - 387.

FENYÖ, E. M.
KLEIN, E.
KLEIN, G.
Swiech, K. Selection of an immunoresistant Molony lymphoma subline with decreased concentration of tumor - specific surface antigens.
J. Natl. Cancer Inst. 40 (1968), 69.

FENYÖ, E. M.
GRUNDNER, G. Characteristics of murine C -type viruses I.
Int. J. Cancer 12 (1973), 452.

FENYÖ, E. M.
NAZERIAN, K.
KLEIN, E. Characteristics of murine C - type viruses II.
Virology 59 (1974), 574.

FENYÖ, E. M.
YEFENOF, E.
KLEIN, E.
KLEIN, G. Immunization of mice with syngenic Molony lymphoma cells induces separate antibodys against virion envelope glycoprotein and virus - induced cell surface antigens.
J. Exp. Medicine 146 (1977), 1521 - 1533.

FIDLER, I. J. Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with I - 5 - iodo - 2 desoxyuridine.
J. Natl. Cancer Inst. 45 (1970),773 - 782.

FUKAWA
FUJIWARA
HARADA
NOMOTO
TORISU
Effect of BCG - Vaccine in immune response in mice.
Immunotherapie of Malignant Diseases.
Schattauer Verl. (1978), 143 - 146.

GORCZYNSKI, R. M.
Suppression of T - cell - mediated immunity by cells from progressor animals.
J. Immunology 112.(1974), 1826.

GULAREK et al.
Der Einfluß von Blei auf die Zellvermittelte Immunität gegen Tumore.
In Vorbereitung

HAAS, Th.
SCHALLER, K. H.
VALENTIN, H.
Gefährdung der Umwelt durch Blei und seine Verbindungen.
Deutsches Ärzteblatt 26 (1972), 1803 - 1805.

HIRSZFELD, L.
HALBER, W.
LASKOWSKI, J.
Untersuchungen über serologische Eigenschaften der Gewebe. II. Mitteilung über serologische Eigenschaften der Neubildungen.
Zeitschr. Immunitätsforschung 64, (1972),81.

HUMPHREY, J. H.
WHITE, R. G.
Kurzes Lehrbuch der Immunologie.
G. Thieme Verlag, 2. Aufl. (1972).

KALISS, N.
Immunological enhancement:Condition for its expression and its relevance for grafts of normal tissues.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 129 (1966), 9 - 12.

KAMINSKI
FISCHER
KENNEDY
CALANDRA
Response of pulmonary macrophages to lead.
Br. J. Cancer Inst. 52 (1974), 1605 - 1610.

KOBAYASHI, N.
OKAMOTO, T.
Effects of lead oxid on the induction of lung tumors in syrian hamsters.
J. Natl. Cancer Inst. 52 (1974), 1605 - 1610.

KOLDOVSKY, P.
Tumor specific transplantation antigens.
Recent Results in Cancer Res. 22 (1969), Springer Verlag.

KOLDOVSKY, P.
Carcinoembryonic Antigens.
Recent Results in Cancer Res. 45 (1974), Springer Verlag.

KOLDOVSKY, P.
Immunologische Aspekte des Tumorwachstums.
Lufthygiene und Silikoseforschung Jahresber. 11 (1978), 88 - 99.

KOLLER, L. D.
Immunsuppression produced by lead, cadmium and mercury.
Am. J. Vet. Res. 34 (1973), 1457 - 1458.

KOLLER, L. D.
KOVACIC, S.
Decreased antibody formation in mice exposed to lead.
Nature 250 (1974), 148 - 150.

KOLLER, L. D.
EXON, J. H.
ROAN, J. G.
Humoral antibody response in mice after single dose exposure to lead or cadmium.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 151 (1976), 339 - 342.

KOLLER, L. D.
ROAN, J. G.
Effects of lead and cadmium on mouse peritoneal macrophages.
J. of the Reticuloendothelial Soc. 21 (1977), 7 - 12.

POTT, F.
BROCKHAUS, A.
Vergleich der enteralen und pulmonalen Resorptionsquote von Bleiverbindungen. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Org. B 155 (1971), 1 - 17.

POTT, F.
SCHLIPKÖTER, H. W.
Die Bleibelastung des Menschen. Lufthygiene und Silikoseforschung Jahresber. 9 (1976), 31 - 58.

SCHLIPKÖTER, H. W.
GHELERTER, L.
SONDERFELD, M.
Der Einfluß von Zink und Blei auf die Antikörperbildung. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Org. B 163 (1976), 417 - 424.

SCHLIPKÖTER, H. W.
FRIELER, L.
Der Einfluß kurzzeitiger Bleiexposition auf die Bakterienclearance der Lunge. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Org. B 168, (1979), 256 -265.

SCHOENE, G.
Untersuchungen über Karzinomimmunität bei Mäusen. Münch. Med. Wochenschr. 53 (1906), 2517.

SELL, S.
Immunologie, Immunpathologie, Immunität. Verlag Chemie, 1. Auflage (1977).

SJÖGREN, H. O.
Transplantation methods as a tool for detection of tumor - specific antigens. Progr. exp. Tumor Res. 6 (1965), 289 - 322.

SJÖGREN, H. O. Suggestive evidence that the "blocking antibodys" of tumor bearing individuals may be antigen - antibody complexes. Proc. nat. Acad. Sci. 68 (1971), 1372 - 1375.

STONER, G. D.
SHIMKIN, M. B.
TROXELL, M. C.
THOMPSON, T. L.
TERRY, L. S. Test for carcinogenicity of metallic compounds by the pulmonary tumor response in strain A - mice. Cancer Res. 36 (1976), 1744 - 1747.

TREJO, R. A. Reticuloendothelial and hepatic functional alterations following lead acetate administration. Exp. molec. Path. 17 (1972), 145 - 158.

THOMPSON, S. C. Effect of age and sex on lung - colony - forming efficiency of injected mouse tumor cells. Br. J. Cancer 34 (1976), 566 - 570.

VAN DEN BRENK, H. A.
KELLY, H. Potentiating effect of prior local irradiation of the lungs on pulmonary metastases. Br. J. Radiol. 47 (1974), 332.

WARNATZ, H. Tumorimmunologie Thieme Verlag, 1. Auflage (1975).

WEXLER, H. Accurate identification of experimental pulmonary metastases. J. Nat. Cancer Inst. 36 (1966), 641 - 645.

ZEIDMAN
Mc CUTCHEON
COMAN

Factors affecting the number of tumor metastases; experiments with a transplantable mouse tumor.
Cancer Res. 10 (1950), 357 - 359.

KERKVLIET, N. I.
KOLLER, L. D.
BAECHER, L. G.
BRAUNER, J. A.

Effect of Cadmium exposure on primary tumor growth and cell - mediated cytotoxicity in mice bearing MSB sarcomas.
J. Nat. Cancer Inst.36 (1979), 479 - 483.

Herrn Prof. Dr. Schlipköter, Direktor des Medizinischen Instituts für Umwelthygiene, möchte ich für die Oberlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit danken.

Für die unmittelbare Betreuung, die hilfreiche Unterstützung und zahlreiche Anregungen danke ich Herrn Dr. Koldovsky.

Herrn Dr. Brockhaus und Herrn Dr. Ewers danke ich für technische Hinweise sowie für die Bestimmung der Blutbleispiegel.

Für Ihre freundliche Hilfestellung bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials danke ich Frau Molik.

Mein Dank für die Oberlassung des Tumors gilt Herrn Prof. Dr. Eichmann vom Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

Nicht zuletzt möchte ich allen Mitarbeitern des Medizinischen Instituts für Umwelthygiene danken, die mir geholfen haben.

LEBENSLAUF

Georg Werner Wille

| | |
|---|---|
| 15.4.52 | geboren in Mettmann, als dritter Sohn der Eheleute Alex Wille und Maria, geborene Brüning. |
| 1958 - 1966 | Besuch der katholischen Volksschule in Mettmann. |
| 1966 - 1969 | Lehre als Büromaschinen - Mechaniker mit Abschluß der Gesellenprüfung. |
| 1969 - 1971 | Nebenberuflicher Besuch der Dr. Hallbach Abendrealschule in Düsseldorf. Ablegung der Fremdenprüfung zur Mittleren Reife. |
| 1972 - 1974 | Besuch des W. H. Riehl Kollegs zur Erlangung der Hochschulreife. |
| SS 1975 | Studium der Rechtswissenschaften an der Universität Köln. |
| WS 1975/76 | Beginn des Medizinstudiums an der Universität Düsseldorf. |
| SS 1976 | Zusätzliche Immatrikulation im Studienfach Philosophie. |